

**Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München  
Klinikum Innenstadt  
Direktor: Prof. Dr. Wolf E. Mutschler**

# **Differentielle Genexpression in neutrophilen Granulozyten polytraumatisierter Patienten**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von  
Peter Hinnerk Richter

aus

Ulm

2011

**Mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Biberthaler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Gerd Regel

Priv. Doz. Dr. med. Gregor Kemming

Mitbetreuung durch den  
promovierten Betreuer: Dr. med. V. Bogner

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2011

**MEINEN ELTERN**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Hintergrund.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Allgemeines zur Epidemiologie des Polytraumas.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Induktion und Ausprägung eines posttraumatischen SIRS und MOF .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3. Immunsystem .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3.1. Zelluläres Immunsystem .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3.1.1. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) und Tissue Inhibitors of Metalloproteinases-1 (TIMP-1) .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.2. Tumorgenese Faktoren .....</b>	<b>12</b>
<b>1.3.2.1. BCL2A .....</b>	<b>12</b>
<b>1.3.2.2. ETS-2 .....</b>	<b>13</b>
<b>1.4. Humorales Immunsystem.....</b>	<b>14</b>
<b>1.4.1. Interleukin-1 beta – IL-1 <math>\beta</math>.....</b>	<b>15</b>
<b>1.4.2. Macrophage inflammatory protein-1 <math>\beta</math> - MIP-1 <math>\beta</math>.....</b>	<b>15</b>
<b>2. Zielsetzung .....</b>	<b>17</b>
<b>3. Patienten und Methoden .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1. Studiendesign.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2. Probengewinnung .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.1. Granulozyten .....</b>	<b>20</b>
<b>3.3. RNA-Isolation und Aufreinigung .....</b>	<b>21</b>
<b>3.4. cDNA Synthese.....</b>	<b>23</b>
<b>3.5. Quantitative Real-Time PCR .....</b>	<b>25</b>
<b>3.6. Statistische Auswertung.....</b>	<b>26</b>
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1. Outcome .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1.1. BCL2A .....</b>	<b>36</b>



4.1.2. MMP-9 .....	37
4.1.3. TIMP-1 .....	40
4.1.4. ETS-2 .....	41
4.2. Schädel-Hirn-Trauma .....	43
4.2.1. MMP-9 .....	43
4.2.2. TIMP-1 .....	44
4.3. Bluttransfusionen .....	45
4.3.1. BCL2A .....	45
4.3.2. MMP-9 .....	47
4.3.3. IL-1 $\beta$ und MIP-1 $\beta$ .....	48
4.3.4. Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos .....	52
5. Diskussion .....	53
5.1. Methodische Aspekte .....	53
5.1.1. Probengewinnung .....	53
5.1.2. Patientenkollektiv .....	54
5.1.3. Zellseparation .....	56
5.1.4. Studiendesign .....	57
5.1.5. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) .....	59
5.2. Differentielle Genexpression - Outcome und Massentransfusion von EK61 .....	
5.2.1. BCL2A .....	62
5.2.2. MMP-9 .....	63
5.3. Differentielle Genexpression - Outcome .....	63
5.3.1. ETS-2 .....	63
5.4. Differentielle Genexpression - Massentransfusion von EK .....	64
5.4.1. IL-1 $\beta$ und MIP-1 $\beta$ .....	64

<b>5.5. Differentielle Genexpression - Verletzungsschwere (ISS) und</b>	
<b>Verletzungsmuster .....</b>	<b>65</b>
<b>5.5.1. TIMP-1 und MMP-9 .....</b>	<b>65</b>
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>67</b>
<b>7. Literatur.....</b>	<b>70</b>
<b>8. Abkürzungen .....</b>	<b>78</b>
<b>9. Danksagungen .....</b>	<b>80</b>
<b>10. Publikationen.....</b>	<b>81</b>

## **1. Einleitung und Hintergrund**

### **1.1. Allgemeines zur Epidemiologie des Polytraumas**

Der Begriff „Polytrauma“ beschreibt eine Kombination aus zur gleichen Zeit entstandenen Verletzungen mehrerer Körperteile, bei welcher mindestens eine Verletzung allein oder die Kombination aus mehreren Verletzungen lebensbedrohlich ist [126].

In der Bundesrepublik Deutschland ereignen sich pro Jahr ca. 7-8 Mio. Unfälle, 8,5% davon sind Verkehrsunfälle. Im Jahr 2003 kam es zu 354.534 Verkehrsunfällen mit Personenschaden, davon verstarben 6613. Durchschnittlich verunfallen ca. 0,6% der Gesamtbevölkerung jährlich im Straßenverkehr (468.783 Personenschäden /82.500.000 Einwohner). Die Arbeitsgemeinschaft Polytrauma der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU) ermittelte bundesweit für das Jahr 2005 ca. 35.500 polytraumatisierte Patienten [65]. Die durchschnittlichen Krankenhauskosten eines polytraumatisierten Patienten belaufen sich auf 34.274±22.501 € [47]. In den letzten Jahren sank das Risiko an einem Polytrauma zu versterben, doch die Folgekosten nach einem Polytrauma sind noch immer sehr hoch. Auch aus diesem ökonomischen Aspekt rückt die Behandlung von Schwerverletzten immer mehr in das wissenschaftliche Interesse.

Regel et al. zeigten, dass sich vor allem die präklinische Versorgung der polytraumatisierten Patienten in den letzten Jahren verbesserte. Die Gesamtmortalität sank gleichzeitig von 37% auf 22%. Allerdings steigerte sich die Inzidenz des Multiorganversagens von 15,4% auf 28,2%, die Inzidenz des letalen Multiorganversagens sogar von 13,8% auf 18,6% [107]. Daraus ist zu schließen, dass ein größerer Anteil schwer verletzter Patienten länger überlebt und dass somit mehr Patienten anschließend ein Multiorganversagen entwickeln und daran versterben.

Verbesserungen in der klinischen Versorgung, wie zum Beispiel bessere intensivmedizinische Betreuung und die Minimalisierung der chirurgischen Eingriffe, tragen zu einer Abschwächung der metabolischen und neuroendokrinen Antwort und damit zu einem längeren Überleben bei, dadurch allerdings auch zu weiteren Komplikationen. Dies trägt zusätzlich zur erhöhten Inzidenz des Multiorganversagens bei [5].

## **1.2. Induktion und Ausprägung eines posttraumatischen SIRS und MOF**

Das nach einem schweren Trauma („first hit“) geschädigte Gewebe setzt eine große Menge an RNA, DNA, zytosolischen Organellen, Matrix und Membranfragmenten frei. Hierbei wird der strukturelle Zusammenhalt unterschiedlicher Gewebe zerstört. Dadurch werden molekulare Strukturen freigelegt, die normalerweise dem Immunsystem unzugänglich sind. Dies führt zu einer gewaltigen Exposition zahlreicher unbekannter Antigenstrukturen [42].

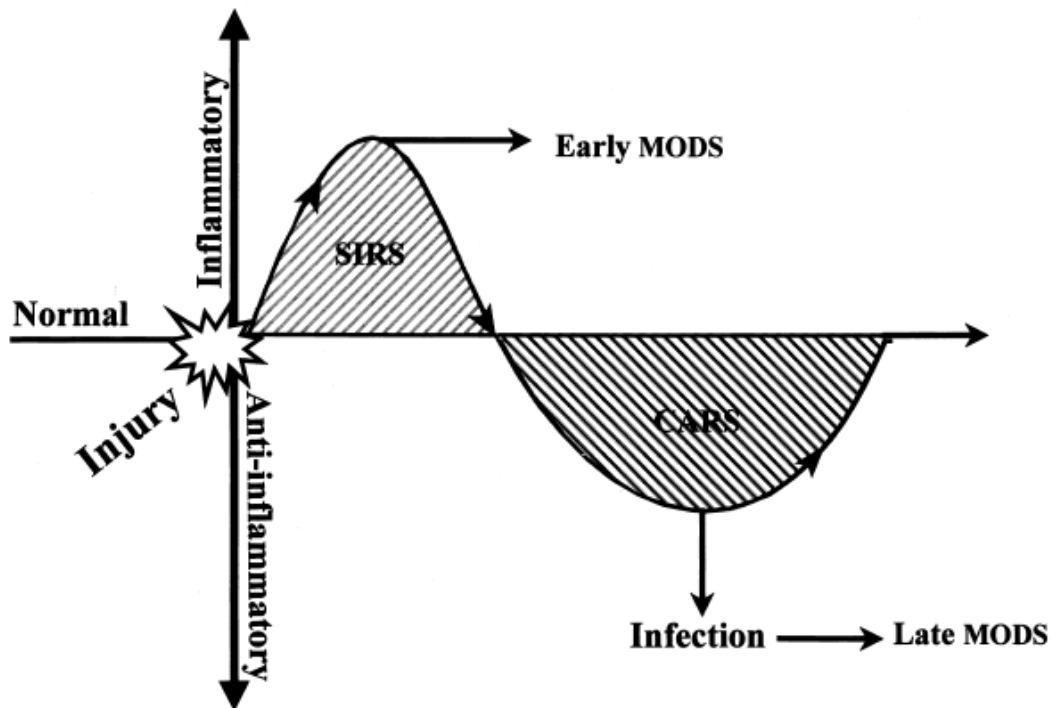
Nach einer anfänglichen Verbesserung folgt rasch eine nachfolgende systemische Entzündungsreaktion (systemic inflammatory response syndrome; SIRS). Dies kann zu einer Störung mehrerer Organe führen, welche bei dem ursprünglichen Trauma nicht beteiligt sind. Diese Folge des SIRS - nämlich das Multiple Organ Dysfunction Syndrome oder das Multiple Organ Failure Syndrome – ist mit einer hohen Mortalität verbunden. Die Mehrheit schwer verletzter Patienten überlebt das initiale SIRS, ohne ein frühes MODS zu entwickeln. Nach einer klinisch relativ stabilen Phase kommt es jedoch häufig zu einer kompensatorischen antiinflammatorischen Reaktion (compensatory anti-inflammatory response syndrome; CARS), welche zu einer Unterdrückung des Immunsystems führt (Abb. 1). Eine nachfolgende Infektion kann wiederum eine Störung mehrerer Organsysteme (late MODS) verursachen, die in ein Multiorganversagen (multiple organ failure; MOF) einmünden kann [42, 79]. Trotz stetiger Verbesserung der intensivmedizinischen Versorgung ist die Entwicklung

eines MOF immer noch der entscheidende Faktor für die Spätletalität polytraumatisierter Patienten [91].

Das ohnehin durch das initiale Trauma geschwächte Immunsystem kann durch einen starken Reiz, wie z.B. anästhesiologische Eingriffe, ausgedehnte osteosynthetische Versorgung („iatrogenic load“) sowie zusätzliche Stressoren wie Hypoxie oder Hyperthermie weiter entgleisen [42, 98]. Ferner kann das Versagen eines einzelnen Organs in ein MODS bzw. MOF übergehen [5].

Die erlittenen Verletzungen und die nachfolgende kompensatorische Reaktion des Körpers können zudem eine passagere Ischämie nach sich ziehen, für die verschiedene Organe wie Darm oder Lunge besonders anfällig sind. In der Darmmukosa führt die Minderperfusion zu einer vermehrten Übersiedelung von Bakterien und ihrer Endotoxine in den Kreislauf. Über die Pfortader bewirken sie eine Aktivierung der Lebermakrophagen und dadurch eine Aktivierung des Immunsystems. In Kombination mit der direkten Schädigung der Leber durch die vorangegangene Minderperfusion werden entzündliche Mediatoren (z.B. Akut-Phase Proteine) freigesetzt. Dies wiederum führt zu einer Aktivierung und Ablagerung vor allem der PMN-Granulozyten in der durch passagere Ischämie vorgeschädigten Lunge. Dieser Mechanismus kann wiederum in ein akutes Lungenversagen (adult respiratory distress syndrome, ARDS) münden.

Zusätzlicher Stress, welcher wie bereits erwähnt durch iatrogene Folgeeingriffe, Hypoxie/Hypothermie, Ischämie und Reperfusion sowie Infektionen auftreten kann, führt zu einem „second hit“ Phänomen, welches die Entgleisung des Immunsystems weiter verstärkt [49, 52, 117, 124].



**Abbildung 1:** Dynamischer Ablauf der posttraumatischen Entzündungsreaktion mit initial überschießender Immunreaktion (SIRS) und nachfolgender starker Verminderung der immunologischen Aktivität (CARS). Fällt ein MODS/MOF in die Phase des SIRS, so wird von einem frühen MODS/MOF gesprochen. Fällt dieses in die Phase des CARS, dann spricht man von einem späten MODS/MOF [79]

### 1.3. Immunsystem

Die Immunabwehr des menschlichen Körpers ist sehr komplex, kann aber grundlegend in zwei Systeme unterteilt werden. Unter dem „unspezifischen Immunsystem“ versteht man die erste generelle unspezifische Abwehr. Diese besteht aus anatomischen und physiologischen Barrieren, wie z.B. den obersten Hautschichten und dem dort herrschenden pH-Wert, humoralen Faktoren (z.B. das Komplementsystem), und phagozytierenden Zellen, allen voran Monozyten/Makrophagen und polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN).

Das „spezifische Immunsystem“ zeichnet sich dadurch aus, dass es in der Lage ist Antigene zu erkennen und diese auf humoraler (spezifische Antikörper) und zellulärer Ebene (B- und T-Lymphozyten) spezifisch zu bekämpfen.

In der Literatur ist kontrovers diskutiert, ob der Verlauf der posttraumatischen Entzündungsreaktion dem spezifischen und/oder dem unspezifischen Immunsystem zuzuordnen ist. Mitunter wurde das SIRS eher dem unspezifischen und das CARS dem spezifischen Immunsystem zugeteilt [25, 35, 62, 127, 139]. Mittlerweile geht man jedoch davon aus, dass beide Abwehrreaktionen sowohl mit dem SIRS als auch mit dem CARS verbunden sind. Da sich das SIRS vermehrt an den initial betroffenen Organen ausprägt während das CARS an den verletzungsfernen Organen zu finden ist, können beide Abwehrreaktionen offensichtlich auch zeitgleich an unterschiedlichen Orten auftreten [12, 18, 79, 99, 114].

Es wurde beobachtet, dass nicht nur die körpereigene Abwehrreaktion zu der Entwicklung einer gestörten Immunabwehr führt, sondern auch exogene Faktoren diesen Pathomechanismus mitbewirken können. In diesem Zusammenhang konnten zwei klinische Studien zeigen, dass die Transfusion von Blutprodukten eine Induktion und Verstärkung der akuten inflammatorischen Antwort verursacht. Es ist bekannt, dass die Gabe von Bluttransfusionen bei Traumapatienten mit einer erhöhten Letalität, perioperativen Komplikationsrate sowie einem Risiko eines Multiorganversagens verbunden ist [17, 88]. Ferner geht die Applikation von Blutprodukten mit einem erhöhten Risiko für ein SIRS einher [30].

Obwohl bis heute das genaue „Wann und Wo“ der posttraumatischen Entzündungsreaktion noch nicht geklärt ist, kann man ohne Zweifel davon ausgehen, dass in der immunologischen Reaktion sowohl humorale als auch zelluläre Faktoren eine wichtige Rolle spielen. Somit sind das spezifische und das unspezifische Immunsystem direkt daran beteiligt.

### **1.3.1. Zelluläres Immunsystem**

Wie zuvor erwähnt, kommt die initiale posttraumatische Antwort zu einem großen Teil durch die zellulären Bestandteile des unspezifischen Immunsystems (Monozyten/Makrophagen und PMN Granulozyten) zustande. Makrophagen nehmen durch Phagozytose Antigene auf. Sie präsentieren diese mittels eines Oberflächenrezeptors (major histocompatibility complex; MHC) der Klasse MHC II einem T-Lymphozyten und aktivieren somit das spezifische System [16, 22]. Nach Antigenkontakt durch die Makrophagen differenzieren sich die T-Lymphozyten sowohl zu T-Effektorzellen als auch T-Gedächtniszellen [6, 32]. Die T-Effektorzellen bestehen wiederum aus verschiedenen Gruppen. Die T-Helferzellen sezernieren unterschiedliche Zytokine, welche die Differenzierung der B-Zellen und der Monozyten fördern und tragen zu einer weiteren Aktivierung der T-Zellreihe bei. Die zytotoxischen T-Zellen lysieren die Zellen, die das durch die Makrophagen präsentierte Antigen auf ihrer Zelloberfläche tragen. Die T-Supressorzellen haben eine Kontrollfunktion, indem sie z.B. hemmend auf die Zytokinausschüttung wirken, damit die Immunreaktion nicht unkontrolliert ablaufen kann [61, 72, 100].

Die B-Lymphozyten bilden sich nach Kontakt mit einem Antigen zu Plasmazellen um. Ein kleiner Bestandteil der aktivierten B-Lymphozyten wandelt sich zu Gedächtniszellen um. Diese werden für zukünftige Interaktionen mit demselben Antigen in Lymphknoten gespeichert [142]. Anschließend fördern Lymphokine aus T-Helferzellen die Bildung hochspezifischer Antikörper [111, 122]. Diese Antikörper zirkulieren im Kreislauf und bilden Antigen-Antikörperkomplexe, welche von gewebeständigen Makrophagen phagozytiert werden.

PMN-Granulozyten dominieren die initiale Immunabwehr. Ihre Hauptaufgabe ist die Phagozytose von Mikroorganismen. Nachdem in der ersten Welle PMN-Granulozyten aus dem Gefäßsystem ausgetreten sind, kommt es in einer zweiten Welle zu einer



Auswanderung von Monozyten [105]. Lysate von neutrophilen Granulozyten locken Monozyten effizient an [134] und induzieren somit den Gefäßaustritt der Monozyten mittels Chemokinen [19]. Neben den Chemokinen werden auch Faktoren ausgeschüttet, die bei dem Durchtritt der Granulozyten durch die Endothelmembran von Bedeutung sind (z.B. matrix metalloproteinase-9; MMP-9) [121]. Zudem verstärken PMN-Granulozyten die endotheliale Expression von Zelladhäsionsmolekülen, welche den Arrest von Monozyten an inflammatorisch veränderten Gefäßen unterstützen. Außerdem spielen die PMN-Granulozyten eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von Mikroorganismen, indem sie diese nach Durchbruch durch die anatomischen Barrieren wie die Haut oder die Schleimhäute vernichten [116]. Nach der Aktivierung der PMN-Granulozyten kommt es zu einer Ausschüttung ihres mikrotxischen Arsenal, welches zum Zelltod führt. Wenn dieser Vorgang unkontrolliert abläuft, kann er zu einer Schädigung des gesunden Gewebes (capillary leak an den Gefäßen oder acute lung injury in der Lunge) führen [120]. Polytraumatisierte Patienten benötigen einen stärkeren Stimulus (platelet-activating factor; PAF), um neutrophile Granulozyten zu aktivieren. Dies könnte einen Schutzmechanismus darstellen, um eine exzessive Entzündungsreaktion und somit weiteren Zellschaden zu verhindern [40].

Eine Inkubation neutrophiler Granulozyten mit Plasma von gelagertem Blut ist mit einem signifikanten Anstieg der Ausschüttung inflammatorischer Zytokine assoziiert. Dieser Anstieg ist bei lang gelagerten Blutprodukten (>14 Tage) verstärkt [144]. Des Weiteren wurde dokumentiert, dass Plasma länger gelagerter Erythrozyten die Apoptose der neutrophilen Granulozyten verzögert und diese für die Zytotoxizität vorbereitet, welche durch die Freisetzung von Superoxiden gemessen wurde [8, 78].

Aber auch Veränderungen in der monozytären Funktion beeinflussen die posttraumatische Reaktion deutlich mit [59]. Kampalath et al. dokumentieren

morphologische Veränderungen der Monozyten in Verbindung mit der posttraumatischen Immundefunktionsstörung [59]. Daraus ist zu schließen, dass die Monozyten stark in die initiale Immunreaktion eingreifen.

Die Frage, ob Bakterien an der Entwicklung eines SIRS beteiligt sein müssen, da für die Aktivierung der spezifischen Abwehr eine Präsentation von Antigenen Voraussetzung ist, wurde in der Literatur ebenfalls kontrovers diskutiert. Bei polytraumatisierten Patienten kommt es im Verlauf häufig zu einer passageren Ischämie in verschiedenen Bereichen des Körpers. Besonders anfällig hierfür sind der Gastrointestinaltrakt (z.B. hämorrhagischer Schock) und die Lunge. Die Folge ist ein lokales IRS-Phänomen (inflammatory response syndrome), wie z.B. ein ARDS (adult respiratory distress syndrome), mit der Einschwemmung pro- und antiinflammatorischer Mediatoren und der Übersiedelung durch pathogene Darmbakterien. Es besteht jedoch nicht bei jedem SIRS eine Minderversorgung des Darmes, sodass sich das SIRS zuvor auf ähnlichem Wege entwickelt, seinen Ursprung aber in der Peripherie hat [27, 49].

Kommt es zu einer Ischämie, entleeren sich die Adenosintriphosphat-Reservoirs und senken die Aktivität der Transmembranionentransporter. Dadurch kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation von Ionen und somit zu einem Einfluss von Wasser und einer Schwellung der Endothelzellen [80].

Die Ischämie aktiviert ferner ein Adhäsionssystem zwischen Leukozyten und Endothelzellen und gestattet dadurch die Migration der Leukozyten durch das geschädigte Endothel sowie die Phagozytose durch das Monozyten/Makrophagensystem [64, 70, 80]. Die Expression intrazellulärer Adhäsionsmoleküle (intracellular adhesion molecule; ICAM)-1 und E- und P-Selektinen auf Endothelzellen, Fibronectin und Laminin in der extrazellulären Matrix und Integrine und L-Selektin auf den weißen Blutkörperchen ist dafür verantwortlich.

Obwohl die Reperfusion für das Überleben des geschädigten Gewebes wichtig ist, kommt es zu einer verstärkten Einspülung aktivierter primärer Abwehrzellen, welche stark mit dem geschädigten Endothel interagieren. Dadurch kann sich der Schaden möglicherweise noch weiter verstärken. Dieses Phänomen bezeichnet man als „reflow-paradoxon“ [84]. Es zeigt, dass nicht nur die initiale Ischämie, sondern auch die Reperfusion als Faktor für die Organschädigung zu berücksichtigen ist.

Bis heute ist die Aktivierung des spezifischen Immunsystems in der posttraumatischen Entzündungsreaktion nicht ausreichend geklärt. Es ist möglich, dass es noch andere Aktivierungswege für das spezifische Immunsystem gibt. Beispielsweise lassen sich natürliche Killerzellen (NK-Zellen) durch Faktoren des aktivierten Komplement-Systems oder durch „linker of activated T-cells“ (LAT) aktivieren. Die LAT sind Faktoren, welche von Monozyten ohne spezifisches Antigenexpression exprimiert werden [58, 95, 103].

Die intrazelluläre Steuerung der Monozyten und Granulozytenfunktion bei polytraumatisierten Patienten wurde mehrfach untersucht. Man fand heraus, dass die Immunantwort hierbei vor allem durch immunmodulatorisch wirksame Proteine (Zytokine/Chemokine) vermittelt wurde. Die Ausschüttung dieser Zytokine wird intrazellulär über komplizierte Signaltransduktionskaskaden reguliert. Dies äußert sich vor allem durch eine veränderte Aktivität der Transkriptionsfaktoren (NF- $\kappa$ B, AP-1, etc.). Durch diese Veränderung wird das mRNA-Expressionsprofil vieler unterschiedlicher Gene beeinflusst [50, 82].

Biberthaler et al. haben 2005 in einer genomweiten Microarraystudie von Monozyten das mRNA-Expressionsmuster polytraumatisierter Patienten in der frühen posttraumatischen Phase untersucht. Um potentielle traumasensitive Genexpressionsmuster zu identifizieren, wurden 14500 Gene in Monozyten gleichzeitig untersucht. Sie gingen davon aus, dass durch einen externen Stimulus die

Signaltransduktion intrazellulär über die Endstrecke der mRNA vom Zellkern gehen muss. Diese mRNA wird anschließend weiter in den Ribosomen und dem Golgi-Apparat verarbeitet. Mittels dieser Miroarraystudie konnte erstmals das Expressionsmuster auf der Ebene des humanen Transkriptoms untersucht werden. Sie zeigten bei verstorbenen Patienten eine starke Überexpression eines Netzwerkes proinflammatorischer Gene und intrazellulärer Signaltransduktionswege, welches zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun führt [7].

Die Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos bilden mit weiteren Faktoren (Maf, ATF) den Activating Protein-1 complex (AP-1) [31, 66, 119]. C-Jun und c-Fos sind die potentesten Transkriptionsaktivatoren in dieser Gruppe. AP-1 ist ein wichtiger Faktor in der Regulierung der Genaktivierung proinflammatorischer Mediatoren im posttraumatischen SIRS. In diesem Zusammenhang wird AP-1 auch als potentieller Ansatz für neue pharmakologische Therapien diskutiert [81]. AP-1 (Abb. 2) wird wiederum durch eine Reihe weiterer inflammatorischer Gene wie der Matrix Metallo Proteinase-9 (MMP-9) und dem Tissue Inhibitor of Matrix Metallo Proteinase-1 (TIMP-1) aktiviert. TIMP-1 ist der Inhibitor von MMP-9 und eng mit Interleukin 1  $\beta$  und dem Macrophage Inflammatory Protein 1 beta (MIP-1  $\beta$ ) verbunden. Zudem wird AP-1 von dem Tumorgeneseffektor BCL2A1 und ETS-2 reguliert [31].



Vorgang greift wiederum in immunologische Funktionen ein und verändert diese. MMP-9 kann man deswegen als einen Schalter und Katalysator für die unspezifische und spezifische Immunabwehr bezeichnen.

Die MMP sind außerdem wichtig für die Entwicklung inflammatorischer Erkrankungen. Sie sind eng bei der Regulierung der Aktivität von Zytokinen und ihren Rezeptoren beteiligt [97]. Auf der anderen Seite wird die Expression der MMPs von inflammatorischen Zytokinen wie TNF-alpha, Interleukin 1 und TGF-beta reguliert [55]. MMP-9 Level sind bei Patienten, die an einer schweren Sepsis versterben, verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe und Patienten, die den Schockzustand überlebten, erhöht [90].

Die Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen wird in vivo von den Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP) kontrolliert [129]. Die TIMP sind multifunktionale, von MMP unabhängige Proteine, die normale Granulozyten aktivieren, vor Apoptose schützen und ihre Migration durch Basalmembranen verhindern [21]. Die TIMP-1 Level sind bei Patienten mit einer schweren Sepsis erhöht. Stark erhöhte TIMP-1 Level zu Beginn einer schweren Sepsis stellen einen prädiktiven Faktor für die Letalität dar [55].

### **1.3.2. Tumorgenese Faktoren**

#### **1.3.2.1. BCL2A**

Die Produktion von Granulozyten aus den myeloiden Vorläufern im Knochenmark wird zum Teil durch Zytokine (G-CSF, GM-CSF) reguliert [86]. Nachdem die Granulozyten in die Blutbahn entlassen werden, wandern sie in Gewebe, wo sie Bakterien phagozytieren. Die inflammatorische Antwort von Granulozyten wird durch ihre kurze Lebensspanne eingeschränkt, welche durch ein intrinsisches Apoptoseprogramm bedingt ist, das eine Aktivierung von Proteasen der Kaspasenfamilie beinhaltet. Der programmierte Zelltod verhindert eine starke Ausschüttung gewebetoxischer

Substanzen und treibt die nachfolgende Beseitigung der verbleibenden apoptotischen Teile durch Makrophagen voran [87, 113]. Die Regulation der Apoptose der Granulozyten ist bislang nicht vollständig geklärt. Allerdings scheint die Bcl-2 Proteinfamilie das Überleben von Granulozyten zu regulieren. In diesen Zellen wird das antiapoptotische A1 exprimiert. Wenn in Granulozyten von Mäusen ein A1-Gen fehlt, kommt in diesen Zellen zu einer beschleunigten Apoptose. Weil Mäuse drei eng verwandte A1 Gene haben, deren Expression in Granulozyten vorkommt, ist es möglich, dass sich der Verlust aller A1 Gene in einer ausgiebigen Apoptose von Granulozyten und somit einer schweren Neutropenie äußert [131].

#### **1.3.2.2. ETS-2**

ETS-2 ist ein Transkriptionsfaktor, der normalerweise durch proinflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren, vasoaktive Peptide und den bakteriellen Mediator LPS aktiviert wird [128]. Alle ETS-Transkriptionsfaktoren binden an eine einzigartige DNA-Sequenz (ETS Binding Site; EBS). Diese EBS konnte in den Promoter/Enhancer-Regionen von viralen sowie zellulären Genen identifiziert werden. Somit kontrollieren die ETS-Transkriptionsfaktoren die Expression von Genen, die für eine Kontrolle der zellulären Proliferation, Differenzierung, Entwicklung, Hämatopoese, Apoptose, Angiogenese und Tumorbildung wichtig sind [118]. In T-Zellen kommt es nach einer Aktivierung zu einer erhöhten Genexpression von ETS-2. Neben der normalen EBS von ETS-2 liegt eine vermeintliche AP-1 Bindungsstelle. Faktoren, die an diese Bindungsstelle binden, vermitteln eine Transaktivierung von AP-1 [74].

Eine Phosphorylierung und Aktivierung von ETS-2 erhöht die Genexpression von Zytokinen, Chemokinen (z.B. MIP-1 $\beta$ ), extrazellulären Proteasen (z.B. MMP-9) und

Adhäsionsmolekülen. Diese sind alle an verschiedenen Aspekten der Entzündung beteiligt [137].

#### **1.4. Humorales Immunsystem**

Bei schweren Verletzungen setzt das geschädigte Gewebe unterschiedliche intrazelluläre Faktoren frei, die das unspezifische Immunsystem aktivieren. Diese Aktivierung äußert sich unter anderem in einer Aktivierung des Komplementsystems [42]. Hierbei kommt es sowohl durch den klassischen [55, 139] als auch den alternativen Weg [39, 51] zu einer Spaltung und Aktivierung mehrerer Komplementfaktoren. Wichtig sind in diesem Zusammenhang die Anaphylatoxine C3a und C5a, die unter anderem eine chemotaktische und opsonierende Wirkung besitzen. Durch die Chemotaxis werden Entzündungszellen zu dem Ort des Traumas gelockt, und durch die Opsonierung wird die Phagozytose eingeleitet. Die Bindung von C5a legt *in vitro* Signalwege lahm und führt zu einem Funktionsverlust dieser Abwehrzellen in Bezug auf das initiale Immunsystem [135]. In Zusammenhang mit dem Verbrauch von Komplementfaktoren bei einem ausgeprägten Trauma [26] kann dies einen Zusammenbruch des gesamten initialen Immunsystems auslösen.

Weitere Aktivierungswege des unspezifischen Immunsystems sind die Bildung von Radikalen wie reaktive Sauerstoffspezies durch neutrophile Granulozyten, Stickstoffmonoxid und Eikosanoide [108, 125, 146].

Abgesehen von diesen lokal wirksamen Mediatoren werden auch Botenstoffe mit einer systemischen pro- und antiinflammatorischen Wirkung (z.B. Zytokine) freigesetzt. Da manche Faktoren jedoch sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken können, ist ihre Zuordnung häufig sehr diffizil [34, 43, 60, 76, 92, 109, 115]. Die mit am besten beschriebenen Zytokine im Rahmen der posttraumatischen Inflammation sind TNF- $\alpha$ ,



Il-6 und Il-8. Zu den antiinflammatorisch relevanten Zytokinen zählen unter anderem Il-10, TGF- $\beta$  und Il-1Ra [10].

Diese beiden Mediatorengruppen steigen in der frühen posttraumatischen Phase mit ihrer systemischen Konzentration je nach Grad der vorangegangenen Verletzung an [35, 43, 54, 60, 77, 92, 93, 104, 123], um im weiteren Verlauf wieder kontinuierlich abzufallen. Hier zeigte sich, dass ein erneuter Anstieg ihrer Konzentration meist mit einer Verschlechterung des Patientenzustandes einhergeht. Außerdem zeigten verstorbene Patienten signifikant erhöhte Plasmaspiegel im Vergleich zu Patienten, die das Trauma überleben [10].

#### **1.4.1. Interleukin-1 beta – Il-1 $\beta$**

Das Precursor-Protein Pro-Il1 wird durch Sekretion in das metabolisch aktive Il-1 $\alpha$  und Il-1 $\beta$  umgewandelt [28, 138], welches bei inflammatorischen Prozessen weitaus bedeutender ist [28, 69]. Il-1 $\beta$  wird von Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen gebildet. Die Freisetzung von Il-1 $\beta$  wird durch Ischämie, Hämorrhagie und mikrobielle Substanzen sowie durch inflammatorische Mediatoren wie C5a und TNF induziert [3, 69]. Il-1 $\beta$  weist im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion ähnliche Wirkungen auf wie das TNF-  $\alpha$  [29, 45, 69]. In diesem Zusammenhang werden Synergismen von TNF-  $\alpha$  und Il-1 $\beta$  bei der Induktion von Fieber und Hypotension, der Adhäsion von Granulozyten an den Endothelzellen, der Synthese von sekundären Zytokinen und der Chemotaxie von Makrophagen beschrieben [3]. Ähnlich wie TNF-  $\alpha$  weist Il-1 $\beta$  eine sehr kurze Halbwertszeit von sechs Minuten auf [53, 69].

#### **1.4.2. Macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ - MIP-1 $\beta$**

Es gibt vier unterschiedliche MIP-1 Typen:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ . Sie sind kleine Proteine (8-10 kDa) und gehören zu den proinflammatorischen Chemokinen der CC-Subfamilie. Die

Gene von CCL-3 und CCL-4 sind in den meisten reifen hämatopoetischen Zellen induzierbar. Vor allem Monozyten / Makrophagen, B- und T-Lymphozyten, PMN-Granulozyten, dendritische Zellen, Mastzellen und NK-Zellen können große Mengen an MIP-1 produzieren. Die Produktion von MIP-1 kann durch verschiedene proinflammatorische Zytokine (z.B. TNF-  $\alpha$ , IL-1  $\alpha$  / $\beta$ , IFN  $\gamma$ ) induziert werden. Auf der anderen Seite wird die MIP-1-Expression durch antiinflammatorische Signale wie IL-4 oder IL-10 gehemmt. MIP-1-Proteine vermitteln ihre biologische Wirkung, indem sie an CC-Chemokinrezeptoren binden, die zu den G-proteingekoppelten Rezeptoren gehören. Ihre Bindung führt unter anderem zu Chemotaxis, Degranulation und Phagozytose [102]. Die MIP-1-Proteine instrumentieren sowohl die akute als auch die chronische Entzündungsreaktion bei Verletzungen oder Infektionen. Sie sind wichtig für die Chemotaxis zirkulierender T-Lymphozyten zum Ort der Entzündung. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle bei der Regulation der transendothelialen Monozytenmigration [71, 73, 83, 85]. Die MIP-1-Proteine übernehmen folglich eine entscheidende Rolle in der Pathogenese vieler Erkrankungen (z.B. Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose, Colitis ulcerosa) [1, 83, 85, 89].

In einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe wurde die vermehrte Expression des Transkriptionsfaktors c-Jun in Monozyten im frühen posttraumatischen Verlauf demonstriert. Ferner zeigte sich bei allen verstorbenen Patienten eine starke Hochregulation der Expression des Proteins MIP-1 $\beta$  [7]. Auch Liener et al. fanden diskret erhöhte Spiegel von MIP-1 $\beta$  bei verstorbenen Patienten mit einem ISS>9 zu 4-6 Stunden nach dem Trauma [68]

## **2. Zielsetzung**

Mit einer vorangegangenen genomweiten Microarraystudie unserer Arbeitsgruppe gelang es, einen besseren Einblick der fehlangepassten Reaktion der Monozyten nach schweren traumatischen Verletzungen zu gewinnen. Hierbei wurde eine Gensignatur von Faktoren identifiziert, welche miteinander funktionell interagieren. Diese waren signifikant mit dem Versterben des Patienten verknüpft. Diese Untersuchung wurde jedoch nur an Monozyten durchgeführt. Polymorphkernige neutrophile Granulozyten bilden eine weitere wichtige Abwehrzellreihe des unspezifischen Immunsystems. Aufgrund der Ergebnisse von Studien, die in den letzten Dekaden durchgeführt wurden, um die Rolle der neutrophilen Granulozyten zu untersuchen, zweifelte man daran, dass diese Zellpopulation bei pathologischer Gegebenheiten überhaupt in der Lage ist, Mediatoren zu produzieren [4]. Wenn dies der Fall sein sollte, so bleibt es immer noch unklar, ob eine Gensignatur ähnlich derer der Monozyten und eine unterschiedliche Regulierung in PMN-Granulozyten während der frühen posttraumatischen Phase nachgewiesen werden kann. Zudem stellt sich die Frage, ob ein spezifisches Genexpressionsprofil mit klinischen Parametern assoziiert ist und eine prädiktive Aussagekraft bezüglich des klinischen Verlaufs eines Traumapatienten besitzt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher,

- (i) zu untersuchen, ob es ein spezifisches Trauma-sensitives Genexpressionsmuster in PMN-Granulozyten polytraumatisierter Patienten in der frühen posttraumatischen Phase gibt,
- (ii) zu überprüfen, ob ein spezifisches Genexpressionsprofil mit klinischen Parametern assoziiert ist
- (iii) und schließlich die prädiktive Aussagekraft dieser Gensignatur für den weiteren klinischen Verlauf zu untersuchen.

### **3. Patienten und Methoden**

#### **3.1. Studiendesign**

Die Studie wurde in dem Level 1-Trauma Center der chirurgischen Klinik der LMU München durchgeführt. 40 polytraumatisierte Patienten wurden in die Studie eingeschlossen. Die Einschlusskriterien waren:

- Injury Severity Score (ISS) >16
- Stumpfes Trauma
- Alter mindestens 18 Jahre
- Erste Blutentnahme innerhalb von 90 Minuten nach Trauma

Die Patienten waren aus verschiedenen Gründen (z.B. Schwere der Verletzung, Beatmung/Intubation, Analgesie) nicht in der Lage, eine Einverständniserklärung zu unterzeichnen. Deshalb wurde diese nach Vereinbarung mit der lokalen Ethikkommission (AZ: 012/00) zu einem späteren Zeitpunkt nach Wiedererlangen des Bewusstseins oder, im Falle des Versterbens, durch einen gesetzlichen Vertreter eingeholt. Die Ausschlusskriterien für diese Studie waren Schwangerschaft, maligne oder chronisch infektiöse Erkrankungen, strafrechtliche Verfolgung oder isoliertes Schädel-Hirn-Trauma. Zusätzlich wurden Patienten, die innerhalb von 24 Stunden verstarben, aus der Studie ausgeschlossen. Die Erhebung der klinischen Daten erfolgte nach den Richtlinien der Europäischen Konsensuskonferenz zur Aufnahme von Daten polytraumatisierter Patienten [92]. Das Patientenkollektiv wurde nach der Datenerhebung retrospektiv in verschiedene Gruppen unterteilt.

Nach der initialen Stabilisierung im Schockraum und den notwendigen Operationen wurden die Patienten zur weiteren Behandlung und Überwachung auf die chirurgische Intensivstation verlegt.

Der Schweregrad der Verletzungen wurde anhand des Injury Severity Score (ISS) berechnet [46]. Dabei wird der Körper in sechs Regionen unterteilt:

1. Oberfläche
2. Kopf und Hals
3. Gesicht
4. Thorax
5. Abdomen
6. Extremitäten und Beckengürtel

Für jede Körperregion werden die einzelnen Verletzungen der Schwere nach unterteilt. Die Schweregrade sind: 1) leicht, 2) moderat, 3) schwer, 4) gravierend, 5) kritisch und 6) maximale Verletzung, die nicht überlebt werden kann. Anschließend werden die Punktzahlen der drei am schwersten verletzten Regionen quadriert und addiert. Dieser Score ermöglicht eine Aussage bezüglich zur Mortalität und Morbidität [46].

$$\text{Injury Severity Score, ISS} = a (\text{AIS})^2 + b (\text{AIS})^2 + c (\text{AIS})^2$$

**Abbildung 3:** Berechnung des ISS: Ein Patient mit einer Rippenserienfraktur mit Hämatothorax (gravierende Verletzung / 4 AIS Punkte), einer pertrochantären Femurfraktur (schwere Verletzung / 3 AIS Punkte) und einem retroperitonealem Hämatom (schwere Verletzung / 3 Punkte) erreicht nach der Quadrierung der einzelnen Punktzahlen einen ISS von 34 Punkten.

Zudem wurde das Kollektiv anhand der Anzahl der transfundierten Erythrozytenkonzentrate (EK: Ein EK entspricht ungefähr 300 ml allogenen,

leukozytendepletierten, konzentrierten Erythrozyten) unterteilt. Als Massen-transfusion galt die Gabe von 10 EK oder mehr in den ersten 24 Stunden [23].

Die Patienten wurden anschließend anhand ihres Outcomes nach 90 Tagen und dem zusätzlichen Vorliegen einer traumatischen Hirnverletzung unterteilt. Eine positive initiale kraniale Computertomographie wurde als Kriterium für das Vorliegen eines Schädel-Hirn-Traumas festgelegt.

### **3.2 Probengewinnung**

#### **3.2.1. Granulozyten**

Den Patienten wurden in den ersten 72h nach Trauma zu 6 Zeitpunkten 30 ml EDTA-Blut abgenommen. Die erste Abnahme erfolgte innerhalb von 90 Minuten nach dem Trauma. Die weiteren Abnahmen wurden 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Trauma durchgeführt. Zunächst wurden 30 ml EDTA-Blut mit 42,5 ml Lyse-Puffer (pH ~7,3: 155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM EDTA) gemischt. Die Lyse-Phase dauerte zehn Minuten. Anschließend wurden Proben bei 450xg und 20°C für 20 Minuten zentrifugiert. Um sicherzustellen, dass die Erythrozyten vollständig lysierten, wurde dieser Vorgang zweimal wiederholt. Dann erfolgte eine Verdünnung bis zu einer Endkonzentration von  $1,5 \times 10^8$ , wonach das Zellpellet in 500µl PBS/EDTA-Puffer (pH ~7,4: 0,0027M KCl, 0,137 M NaCl, 0,1 M Phosphatpuffer) resuspendiert worden war. 300µl CD-15-Antikörper beschichtete Microbeads (Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA) wurden mit den Zellen vermengt und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Suspension bis zu einem Volumen von 15 ml mit PBS/EDTA-Puffer aufgefüllt und erneut bei 450xg und 20°C für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500µl PBS/EDTA-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde hierauf auf eine Hochgradienten-Magnet-Zellseparationssäule (Miltenyi Biotech) gegeben und dreimal mit 3ml PBS/EDTA-Puffer gespült. Nachdem

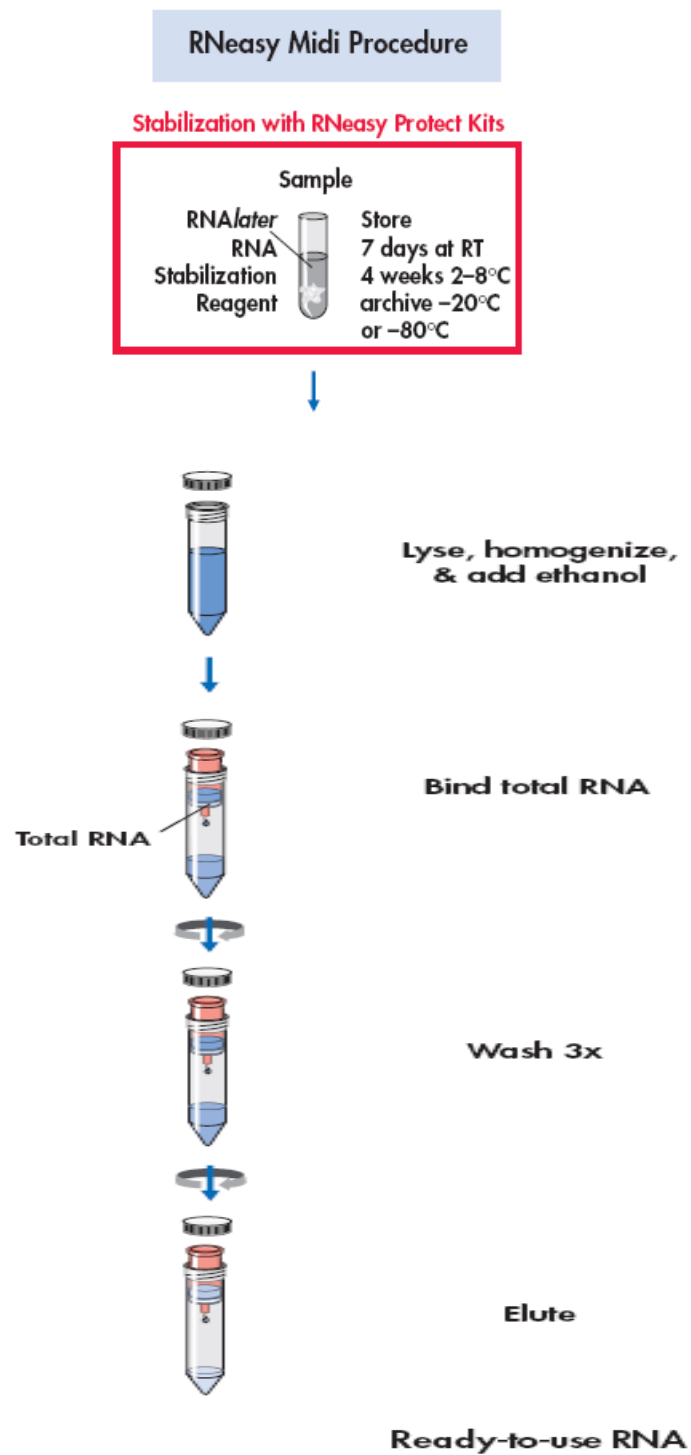
die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt worden war, erfolgte die Zelleluierung mittels 10 ml PBS/EDTA-Puffer. Nach einer Zentrifugation (450xg, 20°C) für zehn Minuten wurden die Granulozytenpellets in 2 ml RLT-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit 0,1%  $\beta$ -Mercaptoethanol lysiert und bei -80°C eingefroren. Die RNA-Präparation der lysierten neutrophilen Granulozyten wurde mit dem RNeasy Midi Kit<sup>TM</sup> (Qiagen) durchgeführt.

### **3.3. RNA-Isolation und Aufreinigung**

Nach der Separation der neutrophilen Granulozyten erfolgte die Präparation der total-RNA unter Verwendung des RNeasy Midi Kits (Qiagen, Abb.4). Dieses Verfahren kombiniert die selektiven Bindungseigenschaften einer Membran, die auf Silicagel basiert, mit der Geschwindigkeit der Spin-Technologie. Ein spezieller Puffer mit hohem Salzanteil ermöglicht, dass bis zu 1 mg RNA, die länger als 200 Basen ist, von der RNeasy Silicagelmembran absorbiert wird.

Die Proben wurden zuerst lysiert und anschließend in Gegenwart eines stark denaturierenden Puffers, welcher Guanidin-Isothiocyanat (GITC) beinhaltet, homogenisiert. Dadurch wurden mit sofortiger Wirkung die RNasen inaktiviert, um eine Isolation von intakter RNA sicherzustellen. Daraufhin wurde Ethanol hinzugefügt, um adäquate Bindungsvoraussetzung zu gewährleisten. In dem nächsten Schritt wurde die Probe in die RNeasy Säule überführt, in welcher die gesamte RNA band und die Verunreinigungssubstanzen effizient ausgewaschen wurden. Die hochqualitative RNA wurde schließlich in RNase-freiem Wasser eluiert. Mit dieser RNeasy-Prozedur wurden alle RNA-Moleküle, die länger als 200 Nukleotide sind, isoliert. Dies führte zu einer Anreicherung der mRNA, da die meisten RNAs über weniger als 200 Nukleotide verfügen (5.8S RNA, 5S RNA, tRNA, die zusammen 15-20% der RNA-Gesamtmenge bilden) und somit selektiv ausgeschlossen wurden.

Die DNA-Entfernung erfolgte anhand des MiniElute Clean Up-Kit (Qiagen) durch DNase-Verdauung.



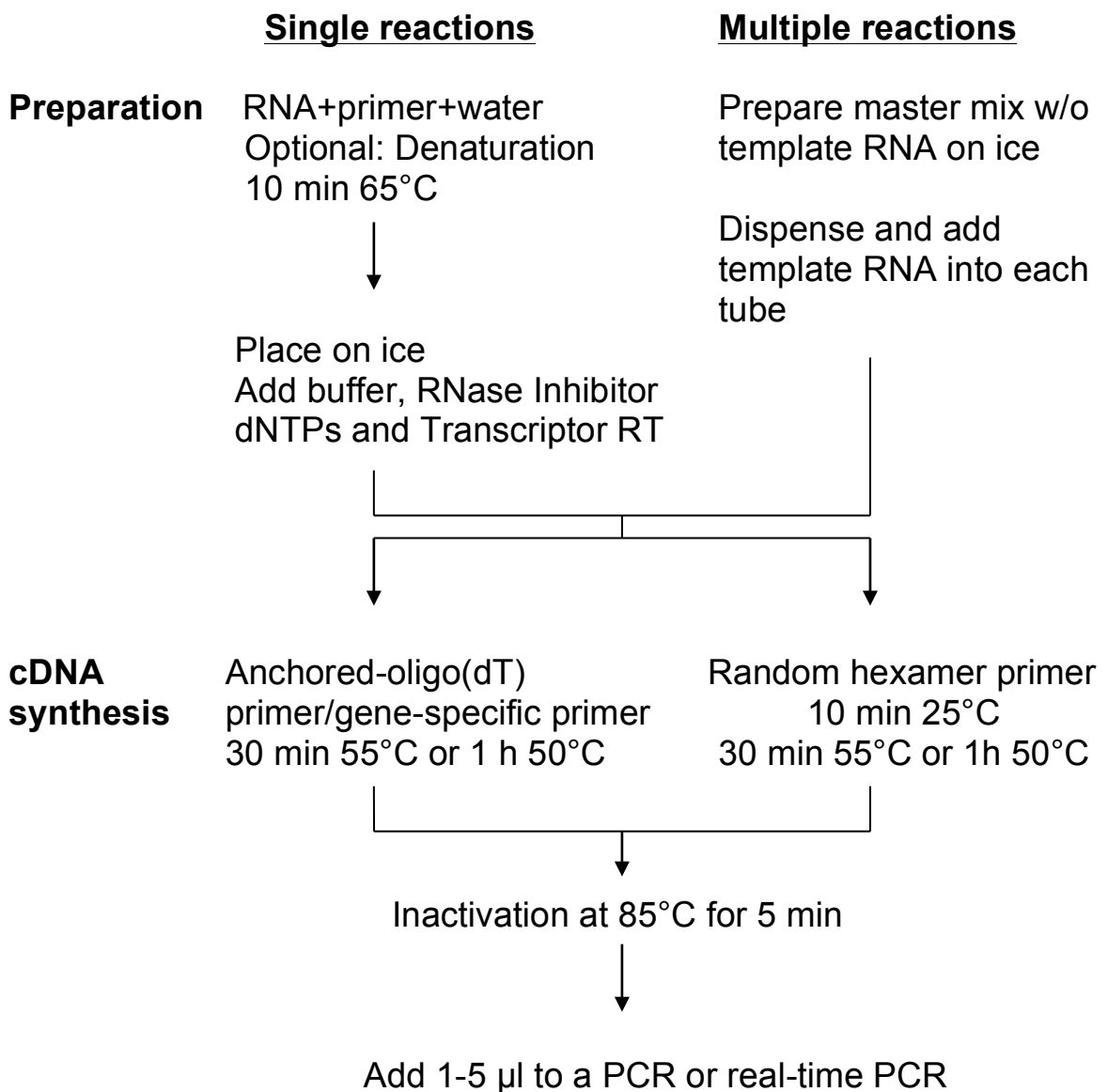


**Abbildung 4: Schematische Schritte der RNA-Isolation:** Im ersten Schritt erfolgt eine Lyse der Zellen mittels RLT-Puffer. Nachdem die Zellen homogenisiert wurden, gibt man 70% Ethanol hinzu. Anschließend wird die Suspension in die RNeasy Midi Säule gegeben und zentrifugiert. Nach 3 Waschschritten wird die RNA schließlich mit RNase-freiem Wasser eluiert (Abbildung: Handbuch, RNeasy Midi Kit, Version June 2001, Qiagen, Valencia, Ca, USA).

### **3.4. cDNA Synthese**

Die cDNA Synthese erfolgte mit dem first-strand cDNA synthesis kit der Firma Roche (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) (Abb. 5). In diesem Verfahren wird die RNA in Doppelstrang-DNA umgeschrieben. Diese kann anschließend mit einer real-time PCR gemessen werden. Die hierbei eingesetzte Transkriptase reverse Transkriptase ist eine rekombinante reverse Transkriptase, welche in *Escherichia coli* exprimiert wird. Dieses Enzym hat eine gegen RNA gerichtete DNA Polymerase-Aktivität und eine DNA-abhängige DNA Polymerase-Aktivität. Zudem verfügt es über eine RNase H-Aktivität, welche RNA in RNA:DNA-Hybride degradiert.

Für diese Studie wurde als Primer ein verankerter Oligo (dT)-Primer verwandt. Dieser wurde entwickelt, um am Anfang des Poly-A-Schwanzes zu binden und somit eine cDNA zu produzieren, die sich über die komplette Länge erstreckt und dadurch das Priming von inneren Stellen des Poly-A-Schwanzes verhindert. Aus dem DNA:RNA-Hybrid wird anschließend durch die RNase H der RNA-Teil abgebaut. Durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase wird der komplementäre DNA-Strang zu dem bereits bestehenden cDNA-Strang synthetisiert. Dies resultiert in einer doppelsträngigen cDNA.



**Abbildung 5: Herstellung der für die qRT-PCR benötigte cDNA** (Abbildung: Handbuch, Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Version April 2007, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland).

### 3.5. Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative real-time PCR wurde mit dem Light Cycler Fast Start DNA SYBR Green Kit (Roche, Mannheim) durchgeführt. Hierbei lagert sich der fluoreszierende Farbstoff SYBR Green I in eine Furche doppelsträngiger DNA an. Zu Beginn der Amplifikation enthält die Reaktionsmischung die denaturierte DNA, die Primer und den SYBR Green I-Farbstoff. Die ungebundenen SYBR Green I-Farbstoffmoleküle fluoreszieren nur schwach und verursachen ein minimales Hintergrundfluoreszenzsignal, welches während der Computeranalyse von der Gesamtfluoreszenz subtrahiert wird. Nach der Bindung der Primer können SYBR Green I-Farbmoleküle an die doppelsträngige DNA binden. Durch diese Bindung kommt es zu einer deutlichen Erregung der SYBR Green I-Farbmoleküle, welche dann stark fluoreszieren. Während der Elongation binden immer mehr SYBR Green I-Moleküle an die neu synthetisierte DNA. Da diese Reaktion kontinuierlich beobachtet wird, kann ein Anstieg der Fluoreszenz in Echtzeit (real-time) dargestellt werden. Während der Denaturierung der DNA in dem Erhitzungsschritt kommt es zu einer Freisetzung der SYBR Green I-Moleküle und folglich zu einem Abfall des Fluoreszenzsignals. Am Ende der Elongation jedes PCR-Zyklus wird die Stärke der Fluoreszenz gemessen, um die zunehmende Menge an amplifizierter DNA zu beobachten.

Die Stärke der Fluoreszenz wurde mit einem Light Cycler (SAA Magna Pure Light Cycler) gemessen. Alle Primer, auch die der Housekeeping-Gene, stammen von Search-LC (Heidelberg, Deutschland). Die detektierten Transkriptionsmengen wurden auf das Level des Housekeeping Gens  $\beta$ -Aktin normalisiert und als Zahl der Transkriptionen pro 10000 CPB-Kopien wiedergegeben.

### **3.6. Statistische Auswertung**

Die Analyse der Expression zwischen den verschiedenen klinischen Gruppen wurde mittels Mann-Whitney-Rank Sum Test im Falle nicht normaler Verteilung und für normal verteilte Variablen mit dem t-Test durchgeführt (SigmaStat, SPSS. Inc.). Die visuelle Darstellung der Daten erfolgte anhand von Sigma Plot 8.0 (SPSS. Inc.). Die Daten wurden als  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Anschließend wurde das prädiktive Potential der Tests anhand von Receiver Operating Curves berechnet (ROC; Analyse IT, Windows). Die Ergebnisse der ROC-Kurven wurden als p-Werte, area under the curve (AUC) und 95% Konfidenzintervalle aufgeführt. Ein p-Wert von  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet.

#### **4. Ergebnisse**

40 Patienten (28 männliche, 12 weibliche) erfüllten die Einschlusskriterien und wurden in die Studie eingeschlossen. Ihr Alter variierte zwischen 18 und 71 Jahren (Mittelwert 42,7 Jahre). Die Verletzungsschwere wurde anhand des Injury Severity Score beurteilt. Die durchschnittliche Verletzungsschwere des gesamten Patientenkollektivs betrug  $37 \pm 14$  Punkte (Mittelwert  $\pm$ SD). Das Verletzungsmuster von 15 Patienten beinhaltete schwere Schädel-Hirn-Traumata (SHT; intrakranielle Läsionen in der initialen kraniellen Computertomographie; CCT). 28 Patienten (70%) überlebten das Trauma, 12 (30%) verstarben. Sechs von den 12 verstorbenen Patienten erlagen im weiteren Verlauf den schweren Hirnverletzungen, die anderen sechs Patienten verstarben an einem Multiorganversagen. Der mittlere ISS ( $\pm$ SD) in Patienten, die das Trauma überlebten, war  $36 \pm 13$  Punkte. Bei verstorbenen Patienten war der ISS  $38 \pm 16$  Punkte. Während des Beobachtungszeitraums entwickelten alle Patienten klinische Zeichen eines Multiorganversagens (MOF Score  $\geq 4$  Punkte). 22 Patienten benötigten innerhalb der ersten 24 Stunden aufgrund ihres hohen Blutverlustes einen massiven Volumenersatz ( $25 \pm 10$  EK) in Form von 10 Erythrozytenkonzentraten (EK) oder mehr. Die restlichen 18 Patienten erhielten  $5 \pm 3$  EK. 11 der 22 Patienten (50%) mit einer massiven Substitution verstarben im Verlauf.

**Tabelle 1:**

<b>Nummer</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Verletzungsmuster</b>	<b>ISS</b>	<b>Verstorben</b>	<b>Massen- Transfundierte</b>	<b>SHT</b>
1	34	M	HWK 5 Fraktur, inkomplettes Querschnittssyndrom, Myokardkontusion, retroperitoneales Hämatom, Leberruptur	33	Nein	Ja (16 EK)	Nein
2	53	M	Lungenkontusion rechts, Rippenserienfraktur, dislozierte Humerusfraktur, dislozierte Tibiafraktur, Fibulafraktur, Galeahämatom	19	Nein	Nein (0 EK)	Nein
3	38	M	SHT I°, Lungenkontusionen bds, Amputationsverletzung oberhalb des Knies	33	Ja	Ja (25 EK)	Nein
4	33	M	HWK Frakturen, Lungenkontusionen bds, BWK1 Fraktur, Open Book Fraktur, Amputationsverletzung der rechten oberen Extremität, Radiusfraktur, Tibiafraktur, Rißverletzung am Schädel	48	Nein	Ja (25 EK)	Nein
5	33	M	Lungenkontusion bds, Rippenfraktur links, Myokardkontusion, mehrere LWK-Frakturen, retroperitoneales Hämatom, Nierenkontusion, Milzkontusion, Tibiafraktur, Acetabulumfraktur, Sacrumfraktur	34	Nein	Ja (24 EK)	Nein
6	59	M	Lungenkontusionen bds, Rippenserienfraktur,	50	Ja	Ja (39 EK)	Nein

			Hämatopneumothorax, Diaphragmaruptur mit Herniation, Myokardkontusion, Milzruptur, Verletzung mesenterialer Gefäße, Ruptur der Sigmas, retroperitoneales Hämatom, Symphysenruptur, Subtrochantäre Femurfraktur, Scapulafraktur, Ulnafraktur, Abriss des Unterarms				
7	33	M	Lungenkontusion bds, LWK 1 Kompressionsfraktur, Tibiafraktur links, bimalleoläre Fraktur bds, Fibulaschaftfraktur, Calcaneusfraktur, Talusfraktur	34	Nein	Nein (2)	Nein
8	74	W	Contusio bulbi links, offene Humerusfraktur mit Beteiligung des Nervus radialis, Beckenringfraktur, Os-sacrum Fraktur, Ileosakrale Fraktur, massives retroperitoneales Hämatom, Metartasale-Fraktur, SWK-Fraktur	26	Ja	Ja (29 EK)	Nein
9	46	M	Fraktur der Schädeldecke, LeFort II°, Lungenkontusion bds, Rippenserienfraktur mit Hämatopneumothorax, BWK Fraktur, Ruptur der A. brachialis, dislozierte Ellenbogenfraktur, massive Destruktion von Haut und Muskel	34	Nein	Ja (22 EK)	Nein
10	44	M	Offenes SHT III°, Impressionsfraktur der Schädeldecke, Fraktur von 2 HWK mit inkompletten Querschnittslähmung, Lungenkontusionen bds, Rippenserienfraktur bds mit Pneumothorax, Leberkontusion, offene Femurfraktur,	57	Nein	Ja (12 EK)	Ja

			Amputationsverletzung Humerus				
11	36	M	Schädelbasisfraktur, Schädeldachfraktur, Orbitafraktur, Ruptur des Trommelfells, Lungenkontusionen bds, Rippenserienfraktur mit Pneumothorax, Processus transversus-Fraktur mehrerer BWK, Radiusfraktur	24	Nein	Nein (0 EK)	Nein
12	33	M	Schwere Muskelverletzung der Brust, dislozierte Humerusfraktur, offene Tibia- und Fibulafraktur, mehrere schwere Hautkontusionen	17	Nein	Nein (6 EK)	Nein
13	46	M	Aortenruptur, Nierenkontusion, Milzhämatom, LWK 4/5 Proc. Spinosus Fraktur, Skrotum- und Penishämatom, Open book Fraktur, Acetabulumfraktur, Os ischiadicum Fraktur, Blutverlust >20%, Tibiafraktur, Radiusfraktur	41	Nein	Nein (8 EK)	Nein
14	39	W	HWK-Fraktur mit kompletter Querschnittslähmung, Processus transversus-Fraktur HWK, Lungenkontusionen bds, BWK-Fraktur, Luxation der Schulter, schwere Verletzung des Auges	45	Nein	Nein (8 EK)	Nein
15	43	M	Rippenserienfraktur mit Pneumothorax, Leberruptur über 10 cm Länge, Milzruptur mit Gefäßbeteiligung, Ruptur der Nierenkapsel, dislozierte Humerusschaftfraktur, Claviculafraktur, Hautrißverletzung am Schädel	41	Nein	Nein (5 EK)	Nein
16	33	W	Subdurales Hämatom, Subarachnoidalblutung,	75	Ja	Nein (5 EK)	Ja



			intrakranielle Blutung, Mittelgesichtsimpressionsfraktur, Orbitaimpressionsfraktur, Acetabulumfraktur, Tibiafraktur, Sprunggelenksfraktur				
17	34	M	Bilaterales intrakranielles Hämatom, Subdurales Hämatom, Lungenkontusion, Lungenriss mit Hämatopneumothorax, Ruptur der A. iliaca interna, retroperitoneales Hämatom, Kontusion des Ileum und des Jejunum, Nierenkontusion, Scapulafraktur, Os sacrum-Fraktur, Acetabulumfraktur, Os pubis-Fraktur, Femurfraktur, Tibiafraktur bds, Os metatarsale-Fraktur, offene Calcaneusfraktur, Fibulafraktur, Patellafraktur	57	Nein	Ja (45 EK)	Ja
18	32	W	Bilaterales subdurales Hämatom, intrazerebrales Hämatom, Nasenfraktur, Lungenkontusion, Rippenserienfraktur mit Pneumothorax, Milzruptur, Acetabulumfraktur, Os ischiadicum-Fraktur, dislozierte Os ilium-Fraktur mit assoziierter Ruptur der A. iliaca, Humerusfraktur, multiple Hautverletzungen	66	Nein	Nein (6)	Ja
19	63	W	Offene Femurschaftfraktur rechts, Femurfraktur links, schwere Rissverletzung der V. femoralis, Bandverletzung am Knie	21	Ja	Ja (14 EK)	Nein
20	45	M	Lungenkontusionen, Amputationsverletzung unter dem	18	Nein	Ja (23 EK)	Nein

			Knie, dislozierte Femurfraktur				
21	62	M	Lungenkontusion bds, Rippenfraktur, Ruptur mesenterialer Gefäße mit schwerem Blutverlust, Kontusion des Jejunum, Beckenringfraktur, Femurfraktur	27	Nein	Nein (8 EK)	Nein
22	51	M	Epidurales Hämatom, subarachnoidales Hämatom, Schädelfraktur, Lungenkontusion, Rippenserienfraktur, LWK-Frakturen, Scapulafraktur	29	Nein	Nein (9 EK)	Ja
23	50	W	Hirnödem, Subarachnoidalblutung, Axisfraktur, Lungenkontusion mit Rippenserienfraktur, Zwerchfellruptur, Nierenruptur mit Ruptur eines Gefäßes, Leberruptur, Milzruptur, Beckenfraktur, LWK 2-5 Fraktur	34	Ja	Ja (32 EK)	Ja
24	40	M	Subdurales Hämatom, schwere Schädeldeckenfraktur, LeFort II°, Lungenkontusionen bds, Rippenserienfrakturen bds, Sprengung der Symphyse, Acetabulumfraktur, Tibiafraktur, Acromionfraktur	50	Ja	Ja (18 EK)	Ja
25	25	W	Epidurales Hämatom, subarachnoidales Hämatom bds, Schädelbasisfraktur, dislozierte HWK-Fraktur mit Rückenmarkskontusion, Kompression des N. opticus, Rippenserienfraktur mit Pneumothorax, Lungenkontusion bds, Myokardkontusion, Pankreaskontusion, Milzruptur, Humerusfraktur, offene Unterarmfraktur, Os pubis-Fraktur,	50	Nein	Nein (8 EK)	Ja

			Acetabulumfraktur				
26	57	M	Subarachnoidalhämatom, Gesichtsfraktur, Hämatothorax bds, Rippenserienfraktur, Sternumfraktur, Ileumdevaskularisation, Femurfraktur, Tibiafraktur	57	Nein	Ja (29 EK)	Ja
27	51	W	Subdurales Hämatom bds, Schädeldeckenfraktur, Subarachnoidalblutung, Rippenserienfraktur mit Hämatopneumothorax, Leberriß, Beckenringfraktur	45	Ja	Ja (17 EK)	Ja
28	29	M	Rippenserienfraktur, LWK-Fraktur, Amputationsverletzung der unteren Extremität	17	Nein	Ja (12 EK)	Nein
29	42	W	Subarachnoidale Blutung, Hirnödem, subdurales Hämatom, Nasenseptumfraktur, Lungenkontusion bds, Radius und Ulnafraktur	36	Nein	Nein (3 EK)	Ja
30	40	M	Processus transversus-Fraktur HWK, LWK-Frakturen mit ventralem Höhenverlust, Massa lateralis-Fraktur, dislozierte Os pubis- und Os ischii-Frakturen, Pilon tibiale-Fraktur, OSG-Fraktur	29	Nein	Nein (2 EK)	Nein
31	71	W	Beckenfraktur, retroperitoneales Hämatom, Femurfraktur, schwere Rißverletzung des Kopfhaut	20	Ja	Ja (28 EK)	Nein
32	18	M	Hirnkontusion mit Mittellinierverschiebung >10 cm, subdurales Hämatom, Lungenkontusionen bds, Claviculafraktur	36	Nein	Nein (2 EK)	Ja

33	32	M	Lungenriß mit Spannungspneumothorax, Femurfraktur, offene Tibiafraktur	34	Nein	Nein (9 EK)	Nein
34	51	W	SHT III° mit Subarachnoidalblutung, subdurales Hämatom, generalisiertes Hirnödem, Hämatopneumothorax, distale Femurfraktur bds (links offen)	43	Ja	Ja (15 EK)	Ja
35	49	M	Rippenserienfraktur mit Hämatopneumothorax, Lungenkontusion, Femurfraktur, Amputationsverletzung unterhalb des Knies	24	Ja	Ja (33 EK)	Nein
36	32	M	Orbitafraktur, Brustkorbverletzung mit Pneumothorax, Rißverletzung des Mesenteriums, Aortendissektion, Leberruptur, Rißverletzung des Sigma, Femurfraktur, Tibiafraktur	34	Ja	Ja (48 EK)	Ja
37	28	W	Rippenserienfraktur mit Pneumothorax, Vaginaausriss, offene Femurfraktur, Beckenfraktur mit retroperitonealem Hämatom, Decollement der Beckenregion und der Oberschenkel bds	34	Nein	Ja (32 EK)	Nein
38	39	M	Rippenserienfraktur mit Pneumothorax, subkapsuläres Milzhämatom	20	Nein	Ja (20 EK)	Nein
39	33	M	Rippenserienfraktur, Lungenkontusion, Rißverletzung des Mesenterium, Desvaskularisierung des Ileum, Humerusfraktur, offene Tibiafraktur	34	Nein	Nein (9 EK)	Nein

40	29	M	Hirnkontusion II°, LeFort II° und III°, Abriss des N. opticus, Lungenkontusion links mit Hämatothorax, Rippenserienfraktur bds, Os pubis-Fraktur, Os ischiadicum-Fraktur, offene Femurfraktur bds, mediale Malleolusfraktur, Os lunatum-Fraktur, Metacarpale III-Fraktur	41	Nein	Nein (8 EK)	Ja
----	----	---	--	----	------	-------------	----

**Tabelle 1: Klinische und epidemiologische Verteilung des Patientenkollektivs Patientenkollektivs**

## 4.1. Outcome

### 4.1.1. BCL2A

Die Patienten, die das traumatische Ereignis (Zeitraum 90 Tage) nicht überlebten, zeigten erhöhte BCL2A Level zu allen Zeitpunkten der Blutentnahme (Abb. 6). Signifikante Unterschiede konnten im Vergleich zu Überlebenden bereits sechs Stunden nach dem Trauma beobachtet werden ( $p < 0,005$ ). Zudem waren die BCL2A-Expressionsveränderungen 72 Stunden nach dem Trauma bei den verstorbenen Patienten signifikant höher als bei Überlebenden ( $p < 0,045$ ).

Um die Qualität der Vorhersage anhand des Tests zu überprüfen, führten wir anschließend eine ROC-Berechnung durch. Exemplarisch ist hier die ROC-Berechnung zu der 6h Abnahme aufgeführt: Daten anhand  $p$ , AUC (area under the curve) und 95% Konfidenzintervall:  $p < 0,0001$ ; 0,78; 0,63-0,93 (Abb. 7).

Abbildung 6:

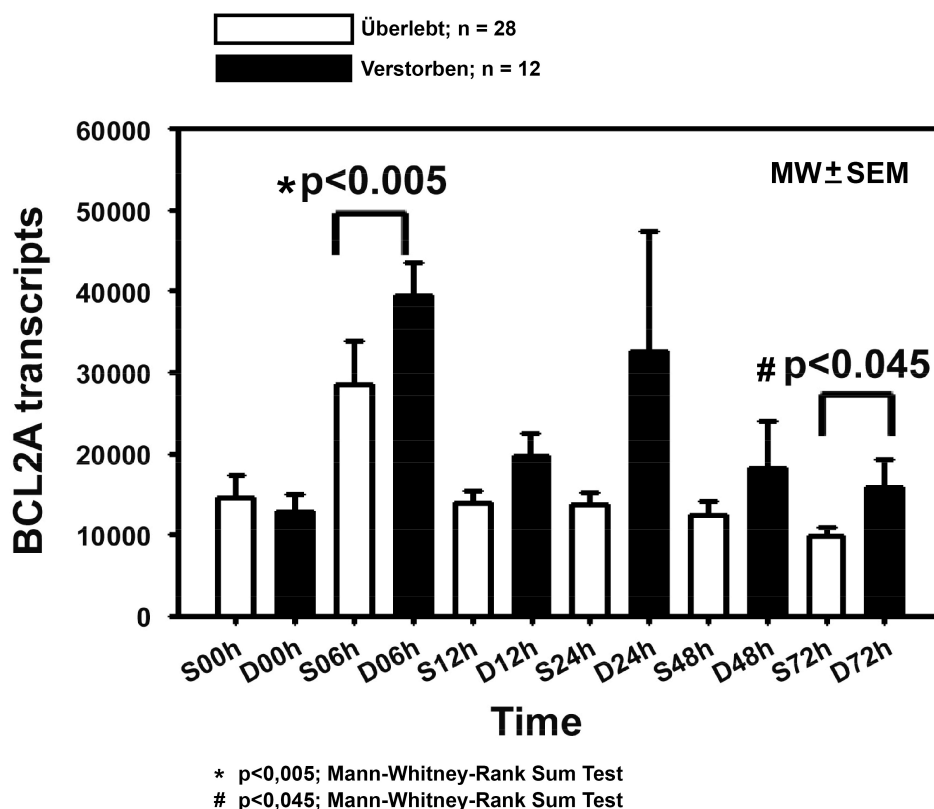


Abbildung 6: Dieser Graph zeigt die BCL2A Genexpression der verstorbenen verglichen mit den überlebenden Patienten über 72 Stunden: S = Survive (n = 28); D = Death (n = 12). Bei der 6h Abnahme zeigt sich ein p-Wert von  $<0,005$ , bei der 72h Abnahme ein p-Wert von  $p<0,045$ . Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-Rank Sum Test.

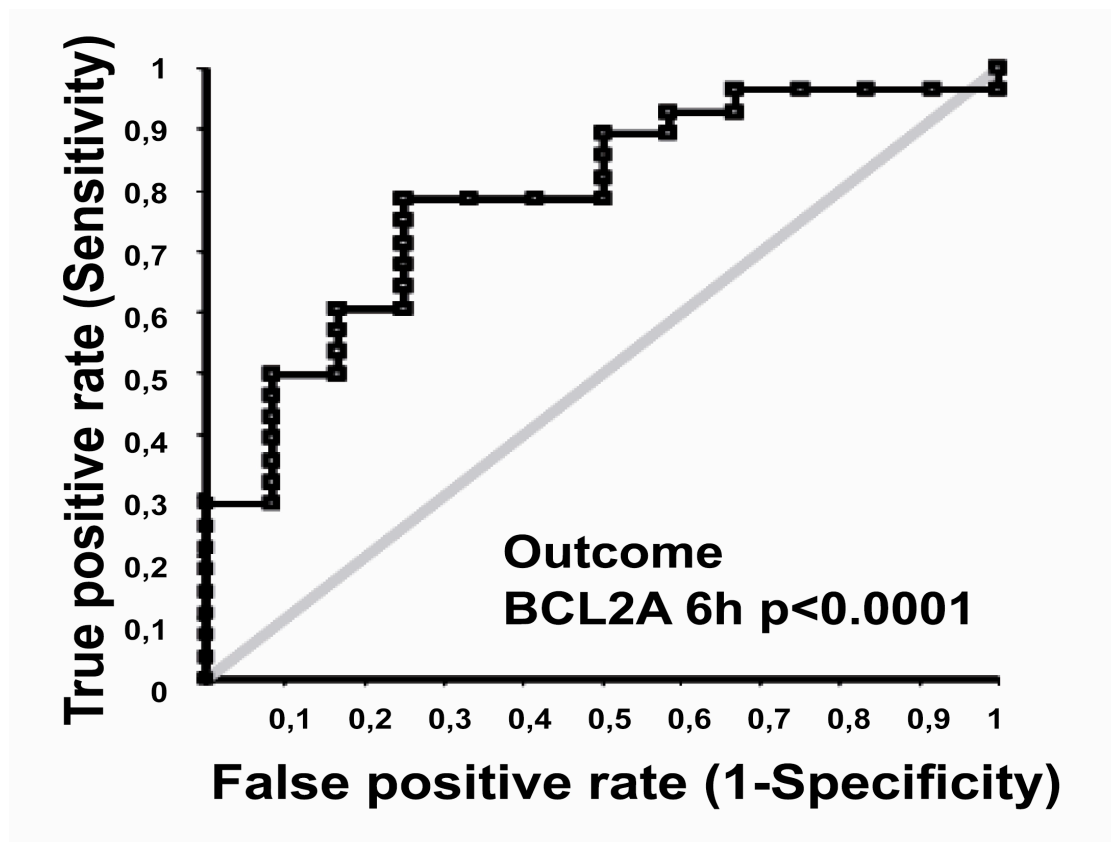


Abbildung 7: Dieser Graph zeigt die ROC-Berechnung von BCL2A bei der 6h Abnahme.

#### 4.1.2. MMP-9

Die Expression von MMP-9 in PMN-Granulozyten zeigte signifikante Unterschiede zwischen den verstorbenen und überlebenden Patienten (Abb. 8). Bei der Abnahme sechs Stunden nach Trauma war die Genexpression von MMP-9 in der Gruppe der

verstorbenen Patienten signifikant erhöht ( $p < 0,011$ ). Ähnliche Veränderungen konnten 24 Stunden nach Trauma dargestellt werden ( $p < 0,025$ ).

Anhand des Konfidenzintervalls erkennt man in den exemplarisch durchgeführten ROC-Berechnung die Qualität der Vorhersage der durchgeführten Tests (ROC-Berechnung 6h:  $p < 0,001$ ; 0,75; 0,58-0,93; Abb 9; ROC-Berechnung 24h:  $p$ , 0,011; 0,72; 0,53-0,92; Abb. 10).

Abbildung 8:

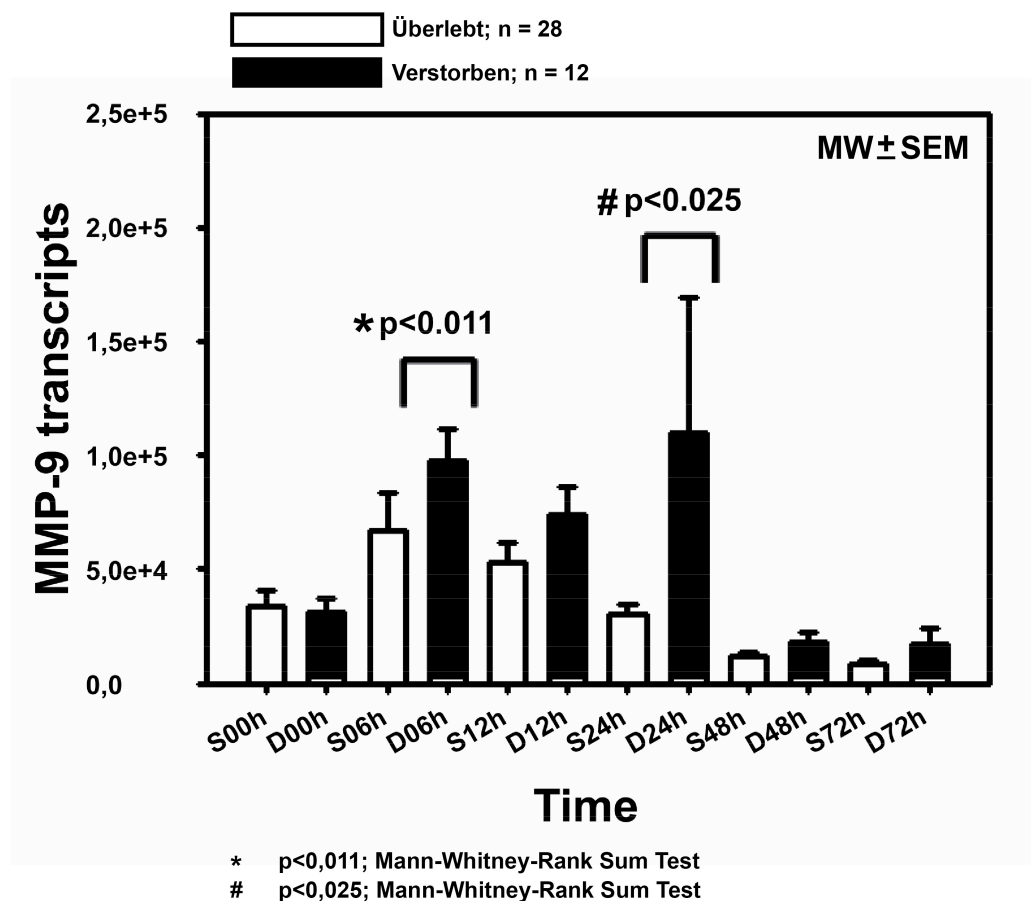
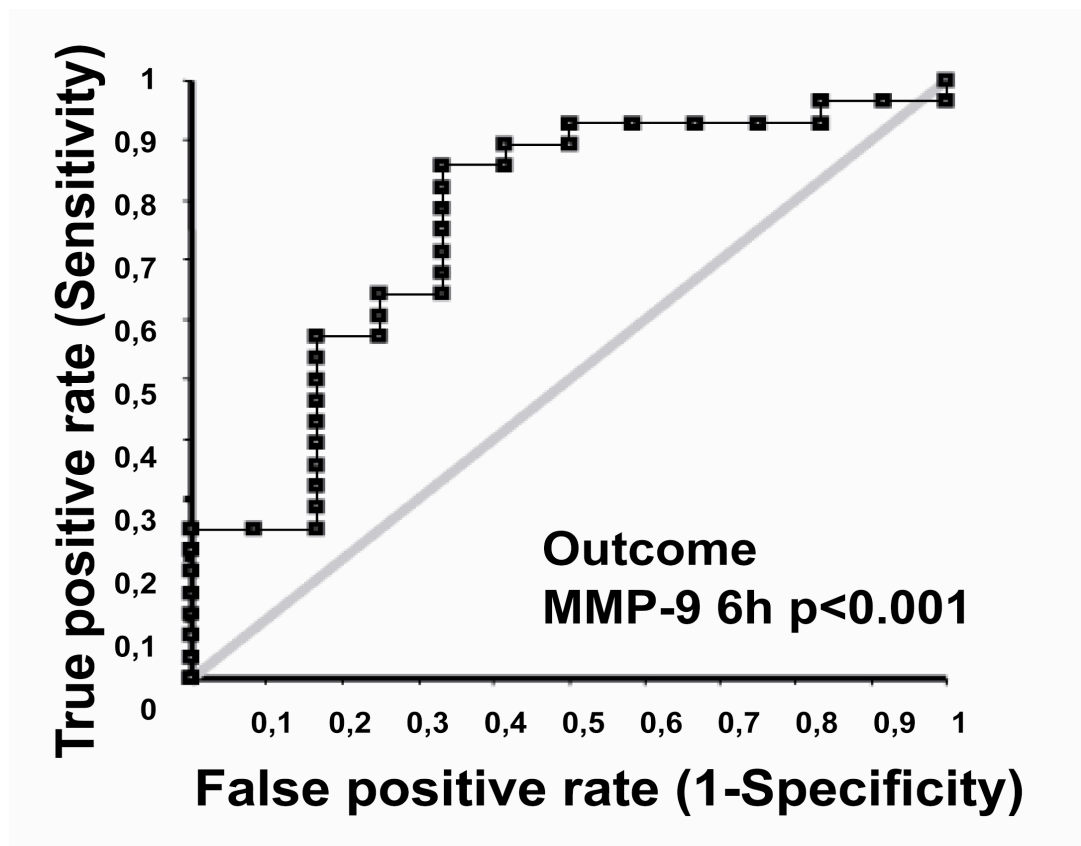




Abbildung 8: Dieser Graph zeigt die MMP-9 Genexpression der verstorbenen verglichen mit den überlebenden Patienten über 72 Stunden: S = Survive (n = 28); D = Death (n = 12 Patienten). Bei der 6h Abnahme zeigt sich ein p-Wert von  $<0,011$ , bei der 72h Abnahme ein p-Wert von  $<0,025$ . Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-Rank Sum Test.



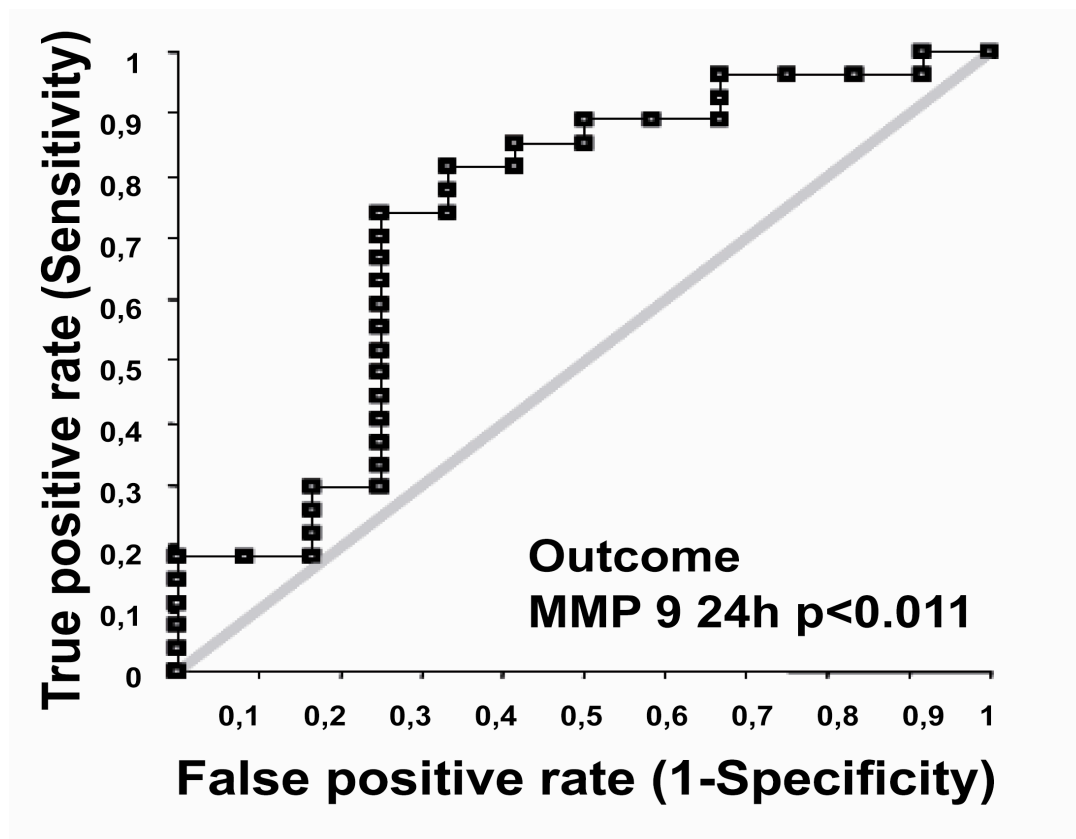


Abbildung 9+10: Dieser Graph zeigt die ROC-Berechnung der Outcomeklassifizierung von MMP-9 bei der 6h und 24h Abnahme.

#### 4.1.3. TIMP-1

Ähnlich wie im frühen posttraumatischen Verlauf von MMP-9 konnte 24 Stunden nach Trauma auch eine signifikant erhöhte Expression von TIMP-1 in der Gruppe der verstorbenen Patienten festgestellt werden (Abb. 11) ( $p < 0,032$ , t-test).

Abbildung 11:

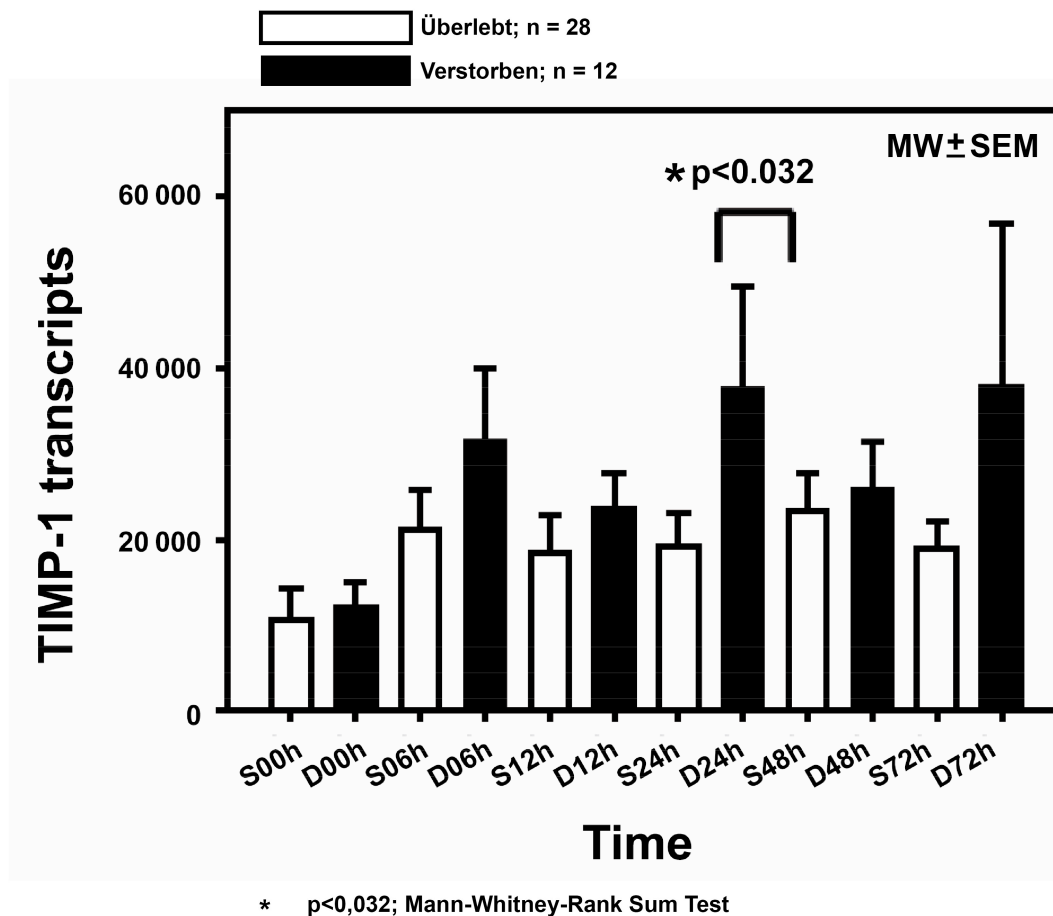


Abbildung 11: Dieser Graph zeigt die TIMP-1 Genexpression der verstorbenen verglichen mit den überlebenden Patienten über 72 Stunden: S = Survive (n = 28); D = Death (n = 12). Bei der 24h Abnahme zeigt sich ein p-Wert von <0,032. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-Rank Sum Test.

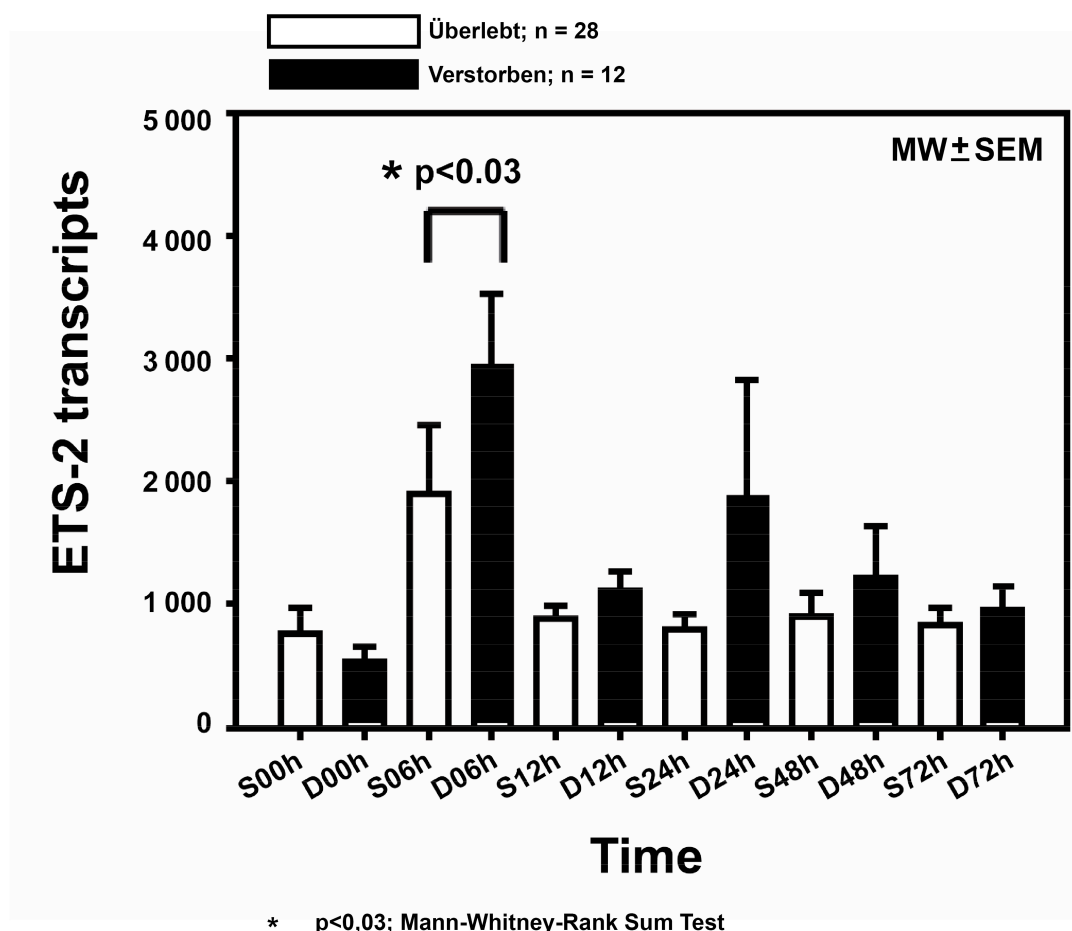
#### 4.1.4. ETS-2

Auch die ETS-2 Genexpression zeigte sich im zeitlichen Verlauf entsprechend verändert (Abb. 12). Diese Expression war sechs Stunden nach dem Trauma bei den

Patienten, die in dem posttraumatischen Verlauf verstarben, signifikant erhöht ( $p < 0,03$ ).

Anhand der anschließend durchgeführten ROC-Berechnung wurde die Qualität der Vorhersage des durchgeführten Tests überprüft ( $p < 0,01$ ; 0,71; 0,51-0,90).

**Abbildung 12:**



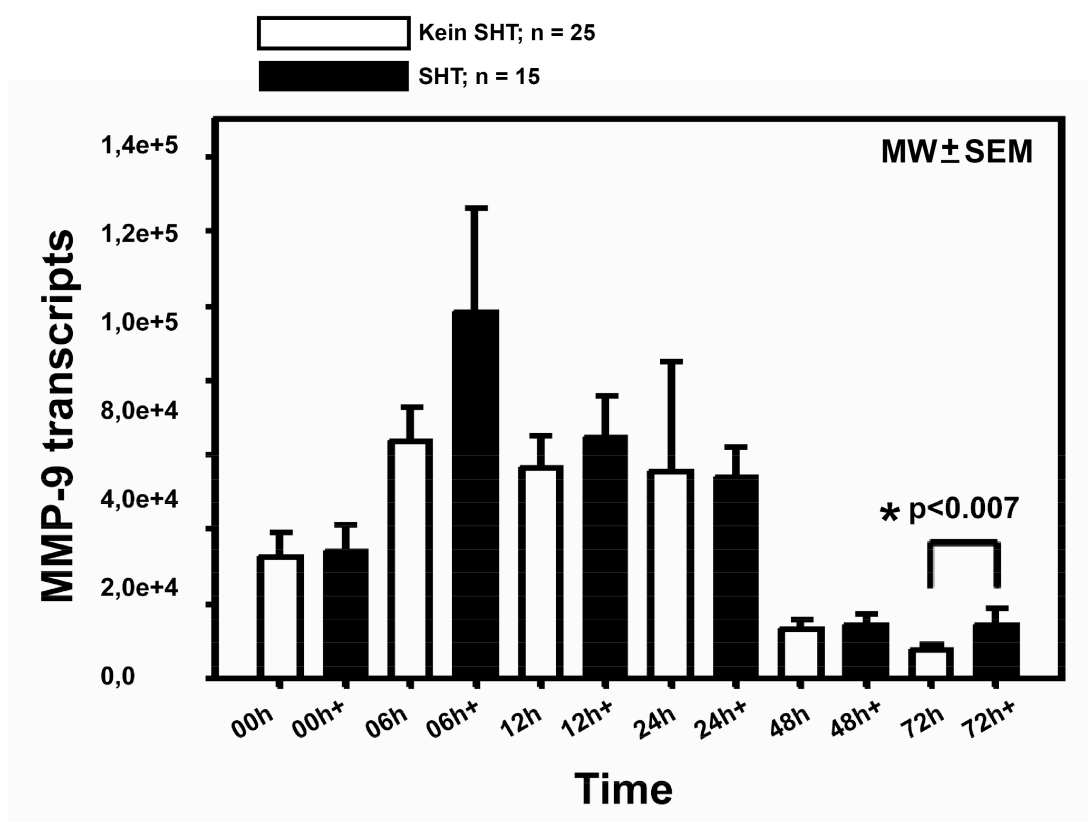
**Abbildung 12:** Dieser Graph zeigt die ETS-2 Genexpression der verstorbenen verglichen mit den überlebenden Patienten über 72 Stunden: S = Survive (n = 28); D = Death (n = 12). Bei der 6h Abnahme zeigt sich ein p-Wert von  $< 0,03$ . Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-Rank Sum Test.

## 4.2. Schädel-Hirn-Trauma

### 4.2.1. MMP-9

Bei Patienten die ein Schädel-Hirn-Trauma erlitten hatten, war im Vergleich zu den polytraumatisierten Patienten ohne ein SHT die Expression von MMP-9 in den untersuchten Monozyten nach 72h signifikant erhöht ( $p < 0,007$ , Abb.13).

Abbildung 13:



\*  $p < 0,007$ ; Mann-Whitney-Rank Sum Test

Abbildung 13: Dieser Graph zeigt die MMP-9 Genexpression der Patienten mit SHT verglichen mit den Patienten ohne SHT über 72 Stunden: Schwarzer Balken = SHT (n = 15); weißer Balken = kein SHT (n = 25). Bei der 72h Abnahme

zeigt sich ein p-Wert von  $<0,007$ . Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-Rank Sum Test.

#### 4.2.2. TIMP-1

Die TIMP-1 Expression war bei polytraumatisierten Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma, verglichen mit den Patienten ohne SHT, zu allen untersuchten Zeitpunkten signifikant erhöht ( $p<0,03$ ; Abb. 14).

Abbildung 14:

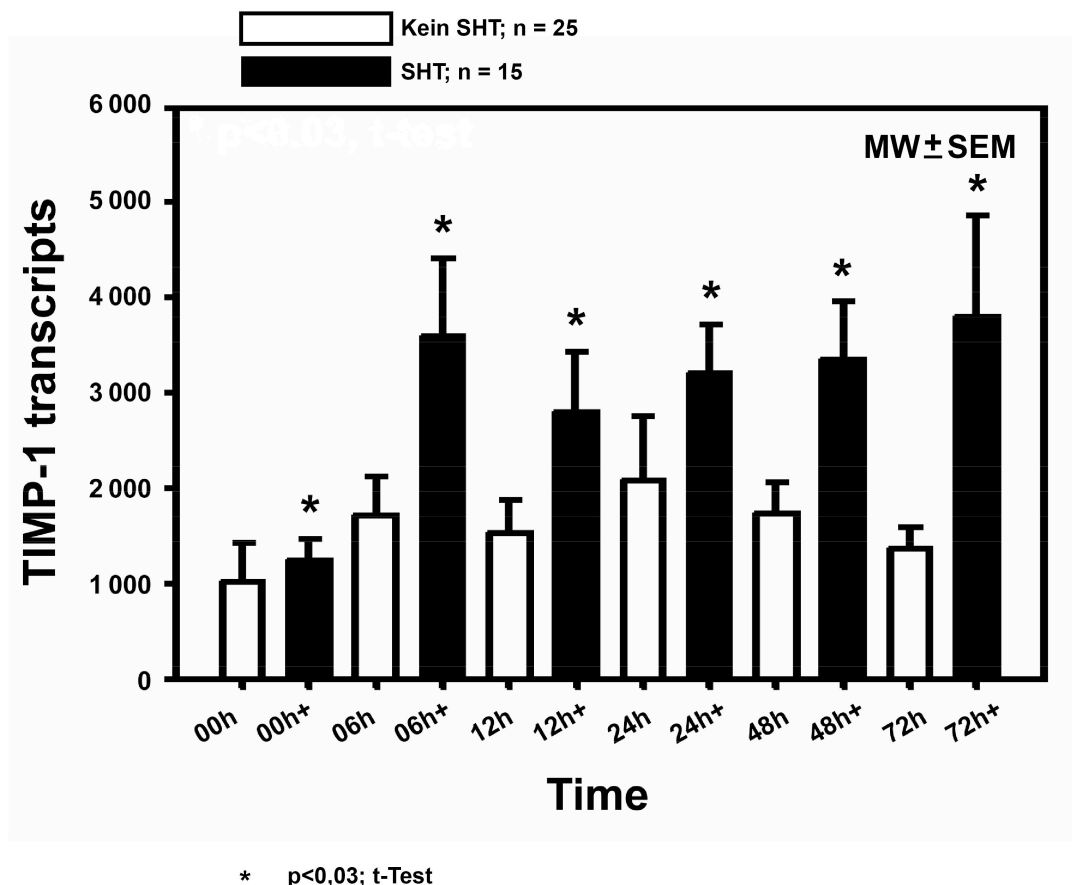


Abbildung 14: Dieser Graph zeigt die TIMP-1 Genexpression der Patienten mit SHT verglichen mit den Patienten ohne SHT über 72 Stunden: Schwarzer

Balken = SHT (n = 15); weißer Balken = kein SHT (n=25). Zu allen Blutabnahmezeitpunkten zeigt sich ein p-Wert von <0,03. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test.

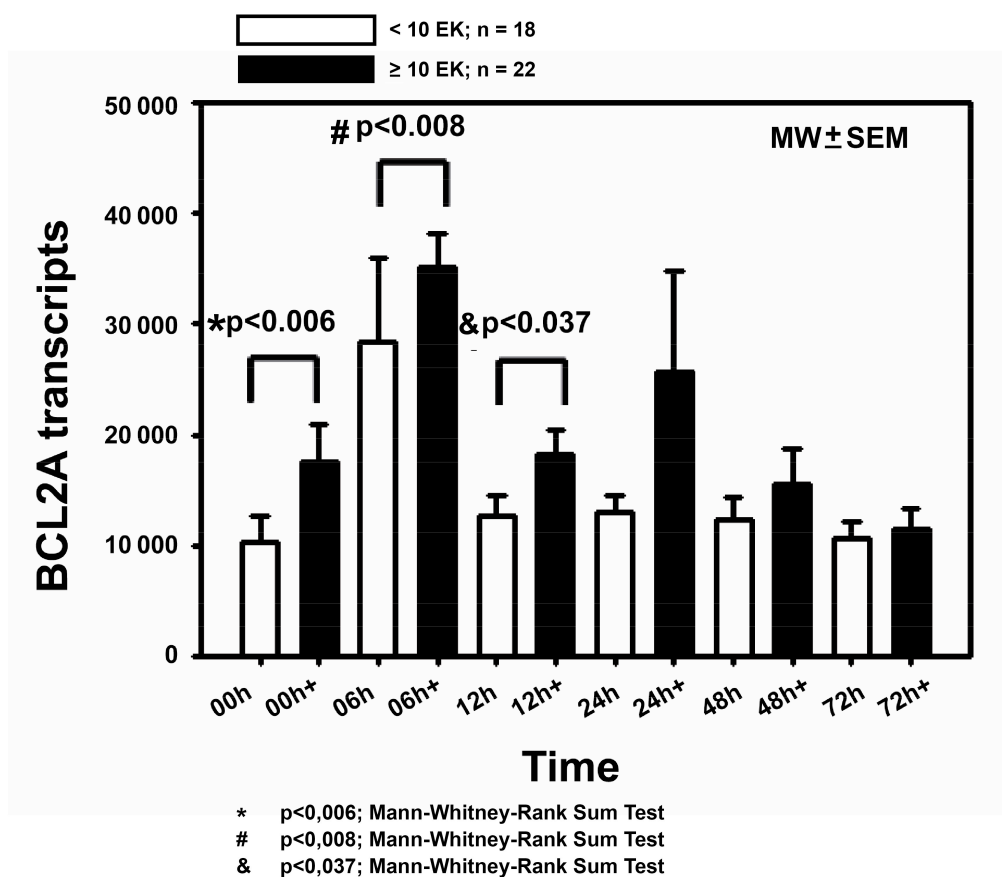
### 4.3. Bluttransfusionen

#### 4.3.1. BCL2A

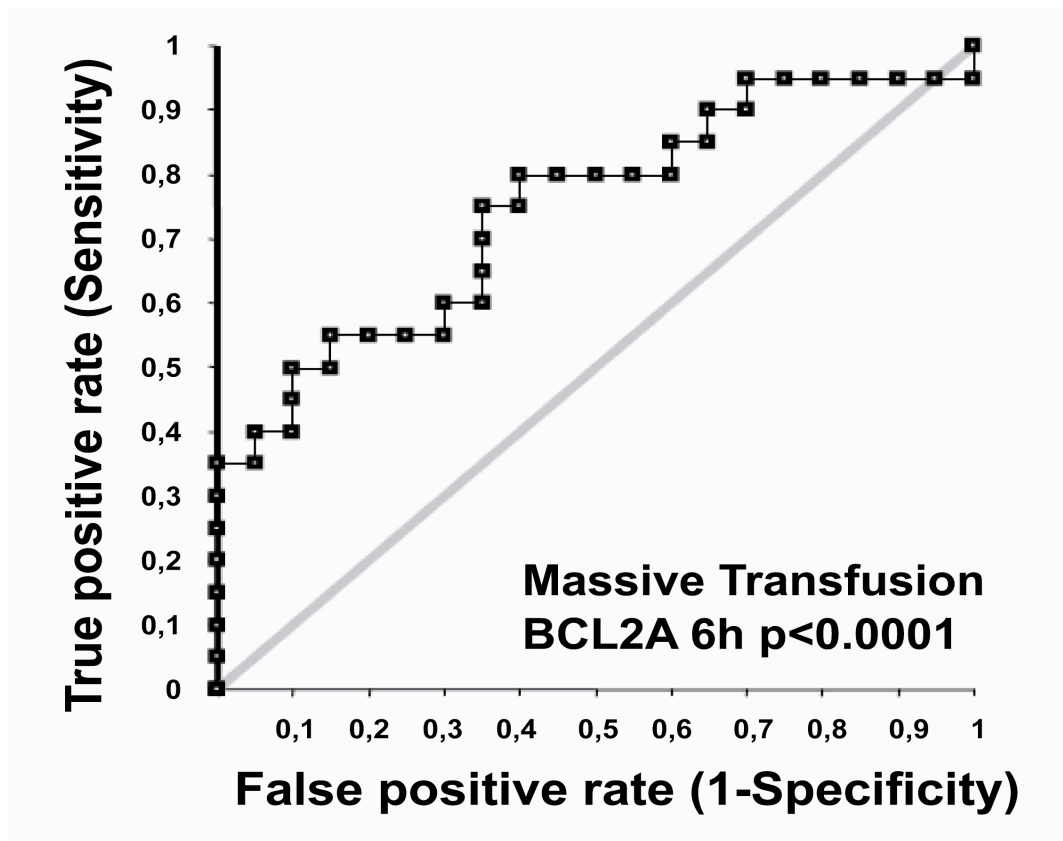
Bei den Patienten mit massiver EK-Substitution waren die BCL2A-Level in der frühen posttraumatischen Phase sowohl bei der Schockraumaufnahme ( $p<0,006$ ) als auch nach 6h ( $p<0,008$ ) und 12h ( $p<0,037$ ) signifikant erhöht (Abb. 15).

Die Qualität der Vorhersage des Tests wurde mittels ROC-Berechnung untersucht (6h:  $p<0,001$ ; 0,72; 0,58-0,90; Abb. 16).

Abbildung 15:



**Abbildung 15:** Dieser Graph zeigt die BCL2A Genexpression bei massentransfunden Patienten verglichen mit Patienten, die weniger als 10 EK in den ersten 24 Stunden erhalten haben, über 72 Stunden: Schwarzer Balken =  $\geq 10$  EK (n = 22); weißer Balken =  $<10$  EK (n = 18). Es zeigt sich ein p-Wert von  $<0,006$  bei der 0h, ein p-Wert von  $<0,008$  bei der 6h und ein p-Wert von  $<0,037$  bei der 12h Abnahme. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney Rank Sum Test.



**Abbildung 16:** Dieser Graph zeigt die ROC-Berechnung von BCL2A bei der 6h Abnahme.



### 4.3.2. MMP-9

Nicht nur BCL2A sondern auch MMP-9 wird nach einem hämorrhagischen Schock und einer konsekutiven Massenerythrozytenkonzentratsubstitution signifikant erhöht exprimiert, sowohl bei der Aufnahme ( $p < 0,03$ ) als auch 12 Stunden nach Trauma ( $p < 0,006$ ; Abb. 17). Zur Überprüfung der Qualität der Vorhersage des Tests ist hier exemplarisch die ROC-Berechnung der 12h Abnahme aufgeführt (ROC-Berechnung 12h:  $p < 0,001$ ; 0,75; 0,59-0,91; Abb. 18).

Abbildung 17:

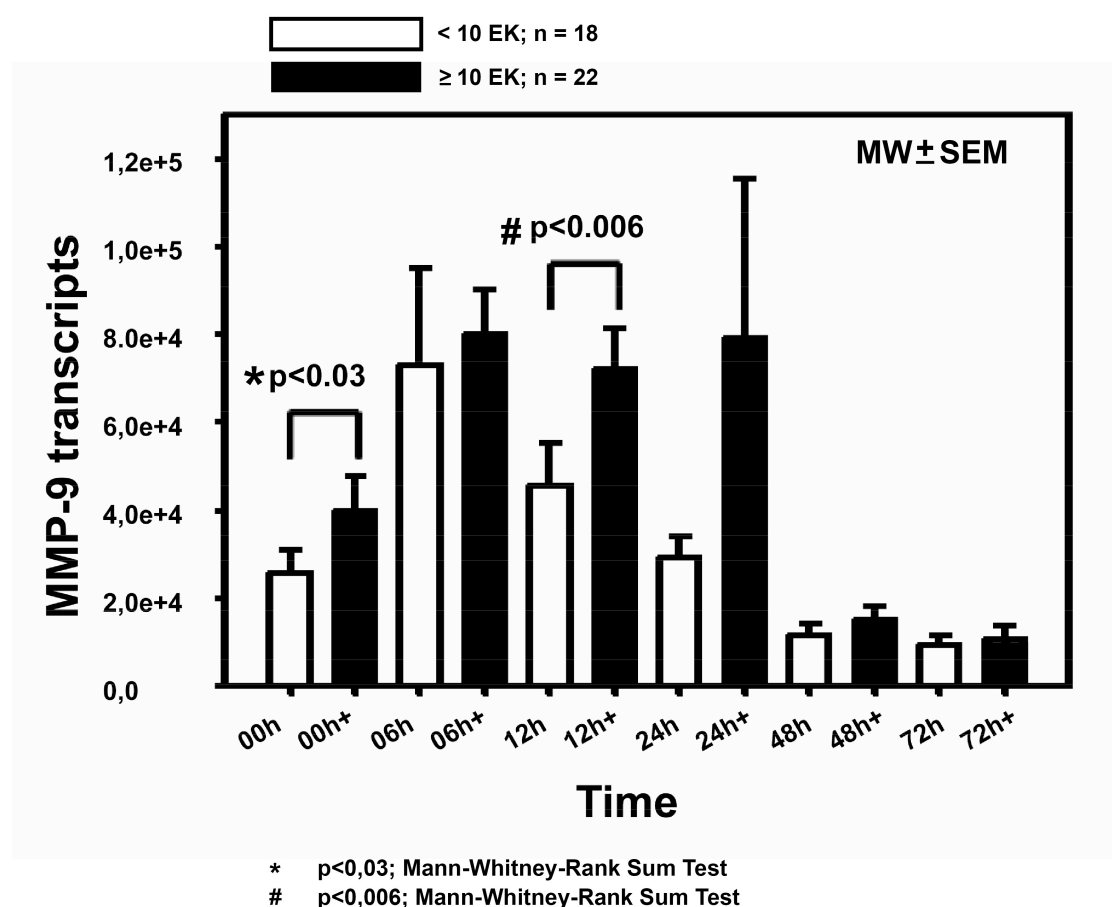
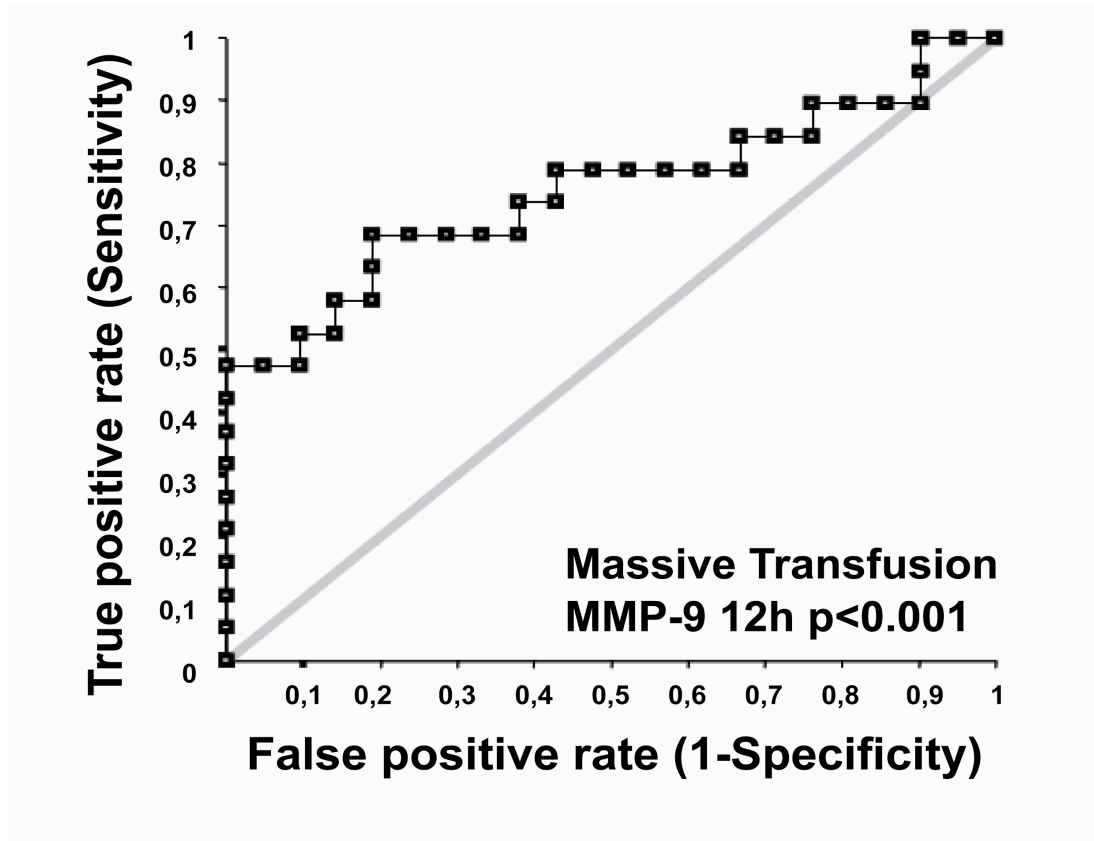


Abbildung 17: Dieser Graph zeigt die MMP-9 Genexpression bei massentransfunden Patienten verglichen mit Patienten, die weniger als 10 EK in den ersten 24 Stunden erhalten haben, über 72 Stunden: Schwarzer

Balken =  $\geq 10$  EK (n = 22); weißer Balken =  $< 10$  EK (n = 18). Bei der 0h Abnahme zeigt sich ein p-Wert von  $< 0,03$ , bei der 12h Abnahme ein p-Wert von  $< 0,006$ . Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney Rank Sum Test.



**Abbildung 18:** Dieser Graph zeigt die ROC-Berechnung von MMP-9 bei der 12h Abnahme.

#### 4.3.3. IL-1 $\beta$ und MIP-1 $\beta$

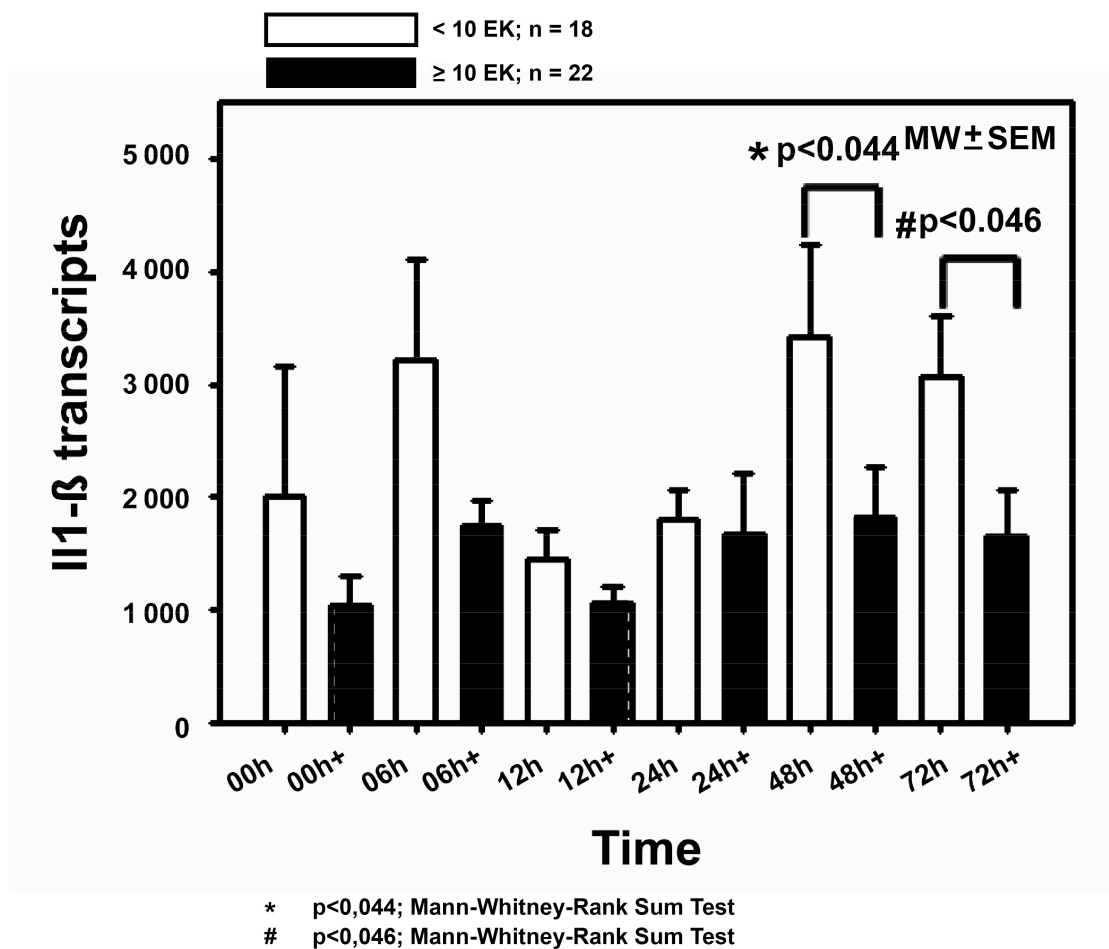
Im Gegensatz zur Hochregulation von BCL2A und MMP-9 bei einem hämorrhagischen Schock und der nachfolgenden Substitution allogener Blutprodukte gibt es in dem in dieser Arbeit untersuchten Signalweg auch suppressierte Gene.

Das pro-inflammatorische Zytokin IL-1  $\beta$  wird in der Gruppe der massentransfunden Patienten nach 48 Stunden herunterreguliert (48h und 72h:  $p < 0,05$ ; Abb. 19). Auch die Expression von MIP-1 $\beta$  ist bei massentransfunden

Patienten supprimiert, hier jedoch nach 12 Stunden ( $p < 0,013$ ) und 24 Stunden ( $p < 0,001$ ; Abb. 20).

Um die Qualität der Vorhersage der durchgeführten Tests zu prüfen, wurden ROC-Berechnung durchgeführt. Exemplarisch sind die Abbildungen 21 und 22 dargestellt (IL-1  $\beta$  ROC-Berechnung 48h:  $p < 0,01$ ; 0,70; 0,52-0,88; Abb. 22 / MIP-1  $\beta$  ROC-Berechnung 24h:  $p < 0,001$ ; 0,73; 0,57-0,89; Abb. 21).

**Abbildung 19:**



**Abbildung 19:** Dieser Graph zeigt die IL-1 $\beta$  Genexpression bei massentransfunden Patienten verglichen mit Patienten, die weniger als 10 EK in den ersten 24 Stunden erhalten haben, über 72 Stunden: Schwarzer Balken =  $\geq 10$  EK (n = 22); weißer Balken = <10 EK (n = 18). Bei der 48h

Abnahme zeigt sich ein p-Wert von  $<0,044$ , bei der 72h Abnahme ein p-Wert von  $<0,046$ . Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney Rank Sum Test.

Abbildung 20:

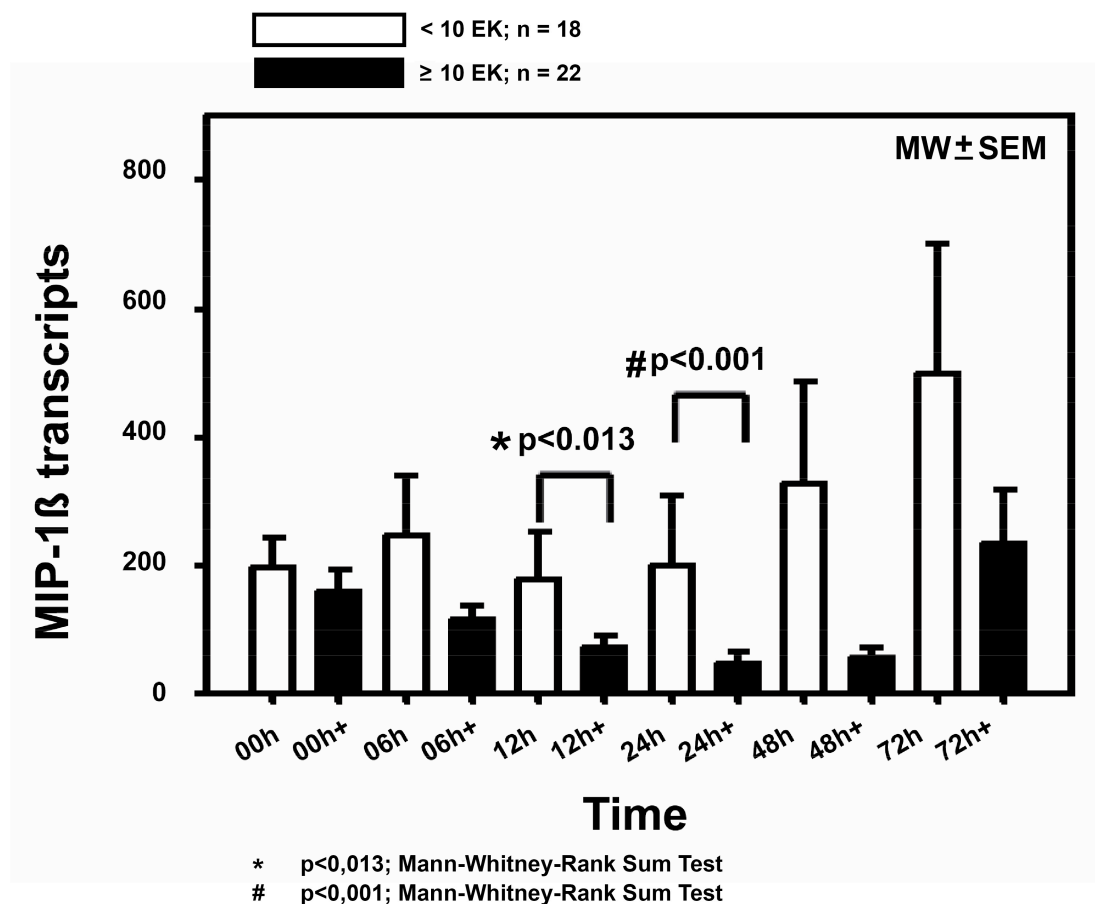


Abbildung 20: Dieser Graph zeigt die MIP-1 $\beta$  Genexpression bei massentransfundenen Patienten verglichen mit Patienten, die weniger als 10 EK in den ersten 24 Stunden erhalten haben, über 72 Stunden: Schwarzer Balken =  $\geq 10$  EK (n = 22); weißer Balken =  $<10$  EK (n = 18). Bei der 12h Abnahme zeigt sich ein p-Wert von  $<0,013$ , bei der 24h Abnahme ein p-Wert

von  $<0,001$ . Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney Rank Sum Test.

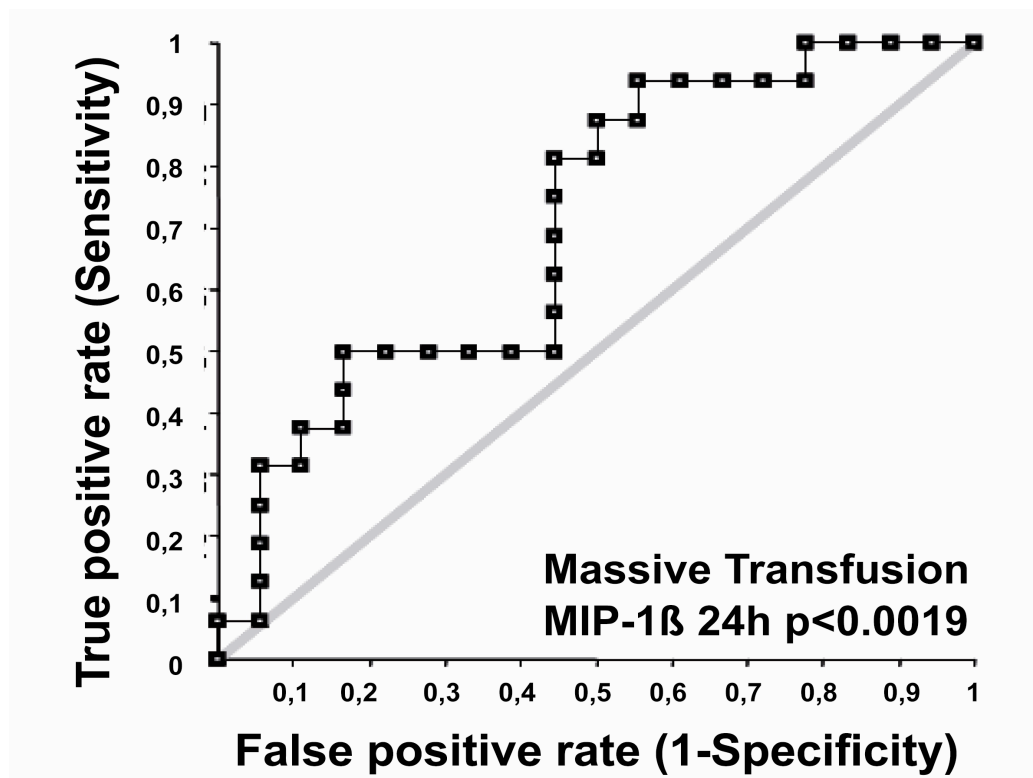
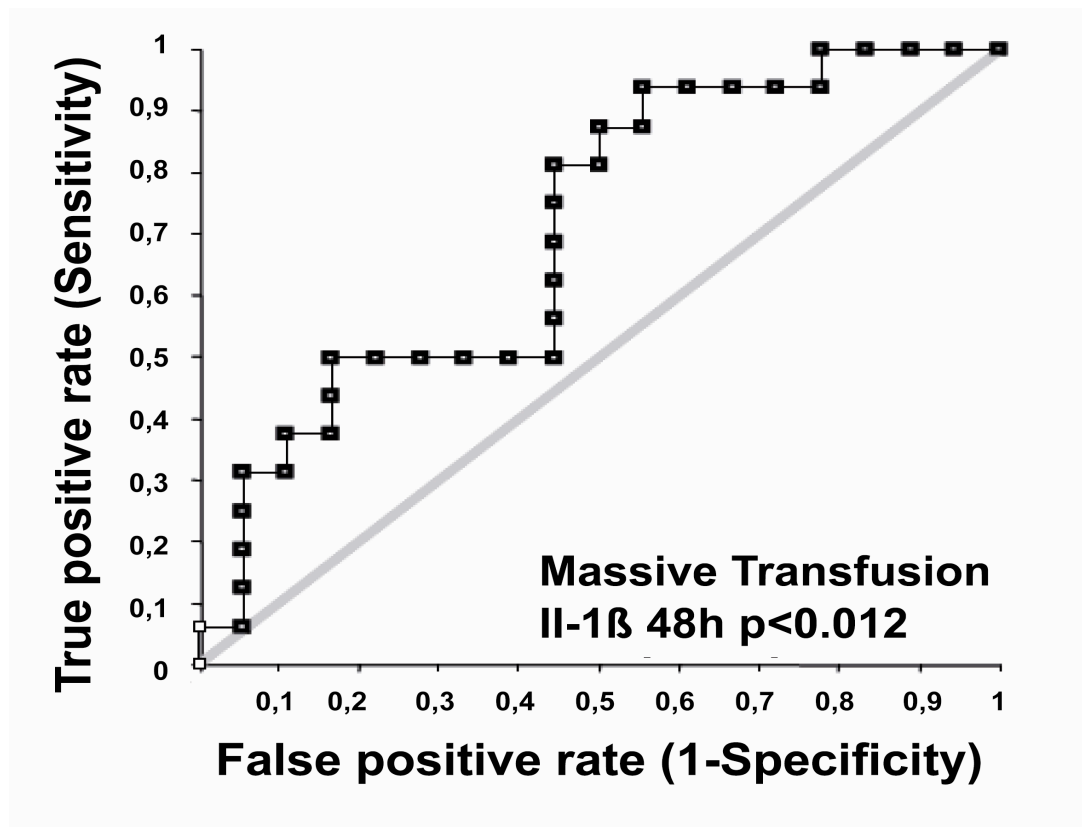


Abbildung 21: Dieser Graph zeigt die ROC-Berechnung von MIP-1β bei der 24h

Abnahme.



***Abbildung 22: Dieser Graph zeigt die ROC-Berechnung von  $Il-1\beta$  bei der 48h Abnahme.***

#### **4.3.4. Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos**

Die Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos, welche zusammen den AP-1 Komplex bilden, zeigten keine zu Outcome, Verletzungsschwere nach ISS, SHT oder Massentransfusion korrelierbare differentielle mRNA Expression.

## **5. Diskussion**

Gegenstand der vorliegenden Untersuchung ist eine sequentielle mRNA-Exploration ausgewählter Gene in PMN-Granulozyten polytraumatisierter Patienten in der frühen posttraumatischen Phase. Die Auswahl der zu untersuchenden Gene basierte auf einer vorhergehenden genomweiten mRNA-Expressionsstudie in Monozyten, welche durch unsere Arbeitsgruppe durchgeführt wurde [7, 9, 11].

Ziel dieser Studie war, erstmalig zu überprüfen, ob das ausgewählte Genexpressionsprofil in neutrophilen Granulozyten überhaupt detektiert werden kann. Im positiven Fall sollte zusätzlich untersucht werden, ob das potentielle Genexpressionsprofil mit verschiedenen klinischen Entitäten korreliert und ob das neutrophile Genexpressionsmuster klinische Aussagen zulässt. Im Folgenden werden unsere Untersuchungen und Ergebnisse detailliert diskutiert.

### **5.1. Methodische Aspekte**

#### **5.1.1. Probengewinnung**

Hinsichtlich der inflammatorischen Antwort nach einem Polytrauma ist die initiale Phase entscheidend. Innerhalb der ersten sechs Stunden kommt es bereits zu einer Aktivierung von Immunzellen [14]. Das zeigt klar, dass die Zeit ein entscheidender Faktor in der Entwicklung und dem Ausgang von Organfunktionsstörungen ist. Deshalb wählten wir ein Studiendesign mit einer möglichst frühen Probengewinnung [79]. Die erste Probenentnahme erfolgte bereits innerhalb der ersten 90 Minuten nach dem Trauma in dem Schockraum der chirurgischen Klinik Campus Innenstadt der LMU. Dies war durch das sehr gut organisierte Rettungssystem in München bei allen Patienten möglich. Die konsekutiven Blutentnahmen erfolgten in regelmäßigen, standardisierten Intervallen 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach

Trauma. Das Blut wurde je nach weiterem Verlauf entweder im Operationssaal oder auf der chirurgischen Intensivstation aus einem zentralen Zugang entnommen. Zu beachten ist, dass es nicht möglich ist mit diesen Blutentnahmezeitpunkten die komplexen Vorgänge polytraumatisierter Patienten gänzlich abzubilden. Eine klinische Studie darf dem Patienten keinen Schaden zufügen. Gerade in unserer sensiblen Patientenpopulation ist das Ausmaß des Blutverlustes ein wesentlicher Faktor für den weiteren klinischen Verlauf und das Outcome. Das Schema, alle sechs Stunden bei Patienten Blut zu entnehmen, wurde bereits in vielen Studien zur Untersuchung der frühen posttraumatischen Entzündungsreaktion bei polytraumatisierten Patienten durchgeführt. Es stellt einen geeigneten Kompromiss zwischen wissenschaftlich interessanten und engmaschigen Zeiträumen sowie der klinischen Vertretbarkeit der Blutentnahmen dar [13, 33, 36]. Dieses Schema fügt dem Patienten keinen zusätzlichen Schaden zu und wurde durch die Ethikkommission als unbedenklich eingestuft.

### **5.1.2. Patientenkollektiv**

In diese prospektive Studie wurden lediglich Patienten mit einem stumpfen Polytrauma eingeschlossen, die mindestens 18 Jahre alt waren und unseren Schockraum innerhalb der ersten eineinhalb Stunden nach dem Trauma erreichten. Der initiale ISS durfte eine Punktzahl von 16 nicht unterschreiten. Das eingeschlossene Patientenkollektiv stimmte mit dem bekannten epidemiologischen Verteilungsmuster (Alter, Verletzungsmechanismus, etc.) von Traumapatienten in Mitteleuropa überein. Im Unterschied zu dem europäischen Verteilungsmuster stehen in Nordamerika vermehrt penetrierende Verletzungen im Vordergrund, verursacht durch Schuss- und Stichverletzungen [34, 112].



Die Unterteilung unseres Patientenkollektivs erfolgte mittels dichotomer Variablen und Gruppenbildung, da die Anzahl unserer Patienten limitiert war. Die Schweregradeinteilung der Verletzungen erfolgte gemäß dem Injury Severity Score (ISS) nach Greenspan [46]. In unserer Studie setzen wir die Einschlussgrenze für die polytraumatisierten Patienten bei einem  $ISS \geq 16$  [110]. Dies ist eine gängige und definitionsgemäße Einschlussgrenze. Um eine dichotome Gruppenbildung der Verletzungsschwere zu ermöglichen, wählten wir den Median unseres Patientenkollektivs als Grenze. Eine weitere dichotome Unterteilung trafen wir anhand des MOF-Score nach Lefering [67]. Kam es im klinischen Verlauf zu einer Überschreitung eines bestimmten Wertes, wurden die Patienten in eine entsprechende Gruppe eingeteilt ( $MOF \geq 4$ : relevantes MOF;  $MOF < 4$  kein relevantes MOF). Kritisch zu sehen ist hierbei die Transformation von kontinuierlichen in dichotome Daten, da sie sehr viele potentielle zufällige Fehlerquellen birgt. Ein Beispiel hierfür ist die Messung des arteriellen Blutdrucks unter einer Therapie mit Katecholaminen. Dieser physiologische Messwert unterliegt häufigen Schwankungen. Der Zeitpunkt der Messung ist ein wesentlicher Faktor bei diesen Schwankungen und kann somit wiederum den möglichen systematischen Fehler verstärken. Deshalb besitzt die Einordnung der Patienten nach dem klinischen Outcome anhand der Genexpression eine bessere prognostische Aussage als eine Einordnung anhand eines Scores (wie bei der MOF-Klassifizierung). Es ist jedoch zu bedenken, dass eine Anwendung dieser Score-Systeme zu einer Veranschaulichung eines komplizierten Zusammenhangs notwendig ist [136].

Um unser Patientenkollektiv auch hinsichtlich der Menge der substituierten Bluttransfusionen zu unterteilen, legten wir die Grenze von mehr als zehn Erythrozytenkonzentraten in den ersten 24 Stunden nach einem Polytrauma fest. Diese Grenze wurde auch von anderen Autoren gewählt [23, 56]. Ein wichtiger

Faktor bei der Transfusion von Blutprodukten im Kontext dieser Fragestellung ist, dass die Granulozyten durch die Applikation von Blutprodukten teilweise aus den Immunzellen des Blutspenders stammen könnten. Bei der Herstellung unserer Standard-Erythrozytenkonzentrate werden die Leukozyten herausgefiltert, die Konzentrate jedoch nicht bestrahlt. Dadurch enthält ein Erythrozytenkonzentrat eine Leukozytenzellzahl von  $0,5-0,7 \times 10^6$  [106]. Eine Blutkonserve enthält in der Regel 300 ml, sodass es zu einer Konzentration von 1,6 Zellen pro  $\mu\text{l}$  kommt. Bei einer normalen Leukozytenverteilung von 5000/ $\mu\text{l}$  ist die substituierte Menge fremder Granulozyten sehr gering. Deshalb kann diese Fehlerquelle weitgehend vernachlässigt werden.

### **5.1.3. Zellseparation**

Die Isolation der PMN-Granulozyten erfolgte mittels der positiven immunomagnetischen Technik (magnetic cell sorting; MACS). Bei dieser Isolation filtert ein Magnet die mit monoklonalen CD15-Antikörpern beschichteten Metallkügelchen selektiv aus dem Blut. Das CD15-Oberflächenantigen ist spezifisch für aktivierte neutrophile Granulozyten. In der Literatur werden noch andere Isolationstechniken diskutiert. Eine davon ist die sogenannte negative immunomagnetische Zellseparation [24]. Der große Vorteil dieser Technik ist, dass die isolierten Zellen nur geringgradig aktiviert werden und es trotzdem zu einer hochgradigen Zelltrennung kommt. Allerdings wird bei diesem Verfahren ein deutlich geringerer Prozentsatz an Granulozyten als bei der positiven immunomagnetischen Separation aus der Blutprobe des Patienten isoliert. Da es sich in unserem Fall jedoch um ein polytraumatisiertes und somit klinisch kritisches Patientenkollektiv handelt, war diese Separation nicht mit unserer Studie kompatibel, denn wir hätten

für eine ähnliche Anzahl an neutrophilen Granulozyten ein wesentlich größeres Blutvolumen abnehmen müssen.

Eine andere Alternative der Immunozellseparation ist die Dichtegradienten-Zentrifugation mittels Ficoll oder Percoll [2]. Von dieser Methode wurde für diese Untersuchung Abstand genommen, da es hierbei zu einer starken Aktivierung der Entzündungszellen kommt [143]. Diese wird sowohl durch den mechanischen Stress der Zentrifugation als auch den Kontakt mit hochmolekularen Zuckerverbindungen hervorgerufen.

Da wir eine hohe Selektion und relativ geringe Aktivierung der PMN-Granulozyten erreichen wollten, erschien uns die positive immunomagnetische Selektion für unsere Studie trotz der verbleibenden Restaktivierung und der höheren Kosten am besten geeignet.

#### **5.1.4. Studiendesign**

In unserer vorhergehenden Studie über die Reaktion für die unspezifische Immunabwehr wichtigen Monozyten führten wir eine genomweite Expressionsuntersuchung durch. Dabei wurde eine charakteristische Genomsignatur identifiziert, welche eine hochsignifikant differentielle Regulation nach einem Trauma aufweist. Diese Signatur besteht nicht etwa aus einzelnen Genen, sondern umfasst mehrere Faktoren. Diese bilden zusammen einen miteinander verbundenen funktionellen Signalweg, der die beiden Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos beinhaltet, die den AP-1 Komplex bilden. Über diesen Komplex ist bekannt, dass er unter pathophysiologischen Bedingungen die Gentranskription reguliert und somit die Expression unterschiedlicher induzierbarer Genen vermittelt [38]. Zudem ist bekannt, dass AP-1 das posttraumatische SIRS und die Sepsis triggert und möglicherweise Schlüsselparameter dieses Mechanismus ist [38, 81].

Überraschenderweise zeigt AP-1 in neutrophilen Granulozyten, anders als bei unseren Monozytendaten, keine differentielle Regulation in Abhängigkeit von den untersuchten klinischen Kriterien. Im Gegensatz dazu konnten wir bei den vor- und nachgeordneten Faktoren, die der Regulation dieses Transkriptionsfaktor-Komplexes unterliegen, sehr wohl eine differentielle Regulation im Bezug auf klinische Entitäten darstellen. Es ist folglich möglich, dass AP-1 in unserem Fall nur als ein Mediator funktioniert, der selbst noch keine differentielle Expression aufweist. Allerdings können alle eindeutigen Effekte nur durch eine Modifikation der Expression der gesamten Kaskade erreicht werden.

Die neutrophilen Granulozyten zählen zu den häufigsten Leukozytenarten in der systemischen Zirkulation. Deswegen ist dieser Zelltyp eine der ersten Zellgruppen des unspezifischen Immunsystems, welche an den Ort der Infektion oder Verletzung gerufen werden. Neben der zentralen Position in der Wirtsabwehr ist diese Zellpopulation für viele andere unterschiedliche inflammatorische Erkrankungen und Zustände verantwortlich. Es wird vermutet, dass die neutrophilen Granulozyten zusammen mit anderen Zellen im Wesentlichen für die Entwicklung posttraumatischer Immunodysfunktions syndrome verantwortlich sind [141]. Sie besitzen anscheinend die Fähigkeit, innerhalb kürzester Zeit ihr Expressionsmuster und damit auch ihre Oberflächenrezeptoren zu verändern [101]. Es ist daher davon auszugehen, dass es in der systemischen Zirkulation während unseres beobachteten posttraumatischen Zeitfensters eine Vielzahl unterschiedlicher Phänotypen und Populationen gibt. Eine solche Annahme könnte die Aussagekraft unserer Studie limitieren, denn es wurden nur CD15-positive neutrophile Granulozyten anhand eines positiven Zellsortierungssystems herausgefiltert, wodurch die möglicherweise vorhandenen anderen Populationen der untersuchten neutrophilen Granulozyten nicht charakterisiert werden konnten.

Es war allerdings nicht das Ziel der jetzigen Untersuchung, die unterschiedlichen neutrophilen Populationen zu beschreiben. Unsere Intention war es eher, ein charakteristisches Genexpressionsmuster darzustellen, welches eine differentielle Regulation in Abhängigkeit von eindeutigen klinischen Entitäten zeigt. Es gibt Hinweise in der Literatur, dass PMN-Granulozyten eine Quelle endogener Zytokine sind, ohne diese allerdings selbst herstellen zu können [140]. Neutrophile Granulozyten sind wichtige pro-inflammatorische Mediatoren, indem sie unter inflammatorischen oder septischen Gegebenheiten eine signifikant veränderte Genexpression aufweisen [63]. Allerdings berücksichtigt unser Studiendesign die Bewertung der Zytokinfreisetzung von neutrophilen Granulozyten nicht, sondern beschränkt sich auf die Darstellung eines bestimmten mRNA-Musters.

Die Unterteilung des Patientenkollektivs in unterschiedliche klinische Gruppen entsprechend ihrem Erythrozythenbedarf schließt einige Vorbehalte ein. Es ist der hämorrhagische Schock, der typischerweise bei einem Trauma zu einer massiven Substitution von Erythrozytenkonzentraten führt. Die beiden Entitäten Blutung und konsekutive EK-Substitution können in einer humanen Studie selbstverständlich nicht unabhängig voneinander untersucht werden. Deshalb ist davon auszugehen, dass die untersuchten Effekte in der Genomantwort ein Ergebnis von beiden Faktoren, nämlich der Ursache und der Behandlung des hämorrhagischen Schocks, sind.

#### **5.1.5. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)**

Die quantitative Real-Time PCR ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung der RNA-Genexpression. Sie gilt hierfür als Verfahren der Wahl [37]. Die hierbei gemessenen Produkte, welche durch jeden einzelnen PCR-Zyklus entwickelt werden, sind direkt proportional zu der am Anfang des PCR-Prozesses vorhandenen Menge an RNA [44].

Die relative Quantifizierung bestimmt die Veränderung der mRNA-Level in einem Gen in einem stabilen Zustand über mehrere Proben hinweg und gibt dieses Gen in Relation zu der Expression eines inneren Kontrollgens (Housekeeping Gen) wider. In unserem Fall war diese Housekeeping Gen  $\beta$ -Aktin. Unter physiologischen oder pathologischen Umständen verändert sich die mRNA-Expression. Das führt zu einer Flexibilität und Variabilität der im Transkriptom enthaltenen Information. Die Präzision der Probengewinnung und der Reinigung der RNA sind die initialen Schritte jedes qRT-PCR-Protokolls und wichtige Faktoren für die Reproduzierbarkeit und der biologischen Relevanz der qRT-PCR-Ergebnisse. Deswegen war die Konstanz der Probengewinnung, des Transports und der Lagerung der Proben von entscheidender Bedeutung.

Unter ungünstigen Bedingungen kann der Farbstoff nicht nur mit der Zielsequenz sondern auch mit Primer-Dimeren oder PCR-Beiprodukten reagieren. Aus diesem Grund erfolgte die Entfernung der DNA im Anschluss an den RNA Isolationsschritt mit dem MiniElute Clean Up Kit (Qiagen) durch DNase Verdauung. Dadurch wurde gewährleistet, dass die RNA Proben DNA-frei waren [15, 44].

Es gibt unterschiedliche Arten der Fluoreszenzerfassung. Bei der unspezifischen Erfassung werden Farbstoffe wie SYBR Green verwendet, welche an Doppelstrang-DNA binden und nach Bindung eine verstärkte Fluoreszenz abgeben. Bei der spezifischen Erfassung werden speziell angefertigte fluoreszente Proben für jede einzelne PCR-Untersuchung angewandt. Die Technik der unspezifischen Farbstofffassung kombiniert den Vorteil, dass die Farbstoffe in schon lang bestehende optimierte Protokolle eingebaut werden können, mit deutlich geringeren Kosten als die spezifische Erfassung [15].

Die RT-PCR kann auf drei verschiedenen Wegen initiiert werden, welche zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können. cDNA Priming kann entweder durch

zufällige Primer, oligo-(dT)- oder zielspezifische Primer ausgeführt werden. Die oligo-(dT)-Primer sind spezifischer als die zufälligen Primer, da sie nicht an rRNA transkribieren. Die oligo-(dT)-Primer können jedoch schwer Transkripte von mRNA mit signifikanten Sekundärstrukturen erzeugen. Zielspezifische Primer sind wahrscheinlich die sensitivste Option für eine Quantifizierung wobei diese Methode viel RNA benötigt. Aus diesen Gründen wurden in der vorliegenden Studie die oligo-(dT)-Primer verwandt [15, 44].

## **5.2. Differentielle Genexpression - Outcome und Massentransfusion von EK**

Prinzipiell zeigen zwei, der von uns untersuchten Gene (BCL2 und MMP-9) eine differentielle Genregulation sowohl hinsichtlich des endgültigen klinischen Outcomes als auch hinsichtlich der massiven Substitution von Erythrozyten. Diese beiden Entitäten können jedoch nicht getrennt voneinander betrachtet werden. Dennoch wurde das Vorliegen einer Massensubstitution von Erythrozytenkonzentraten als ein unabhängiger Risikofaktor für eine höhere Mortalität identifiziert [30, 78]. Es ist eindeutig, dass Patienten, die eine massive Erythrozytensubstitution benötigen, eine schlechtere Prognose besitzen als Patienten ohne Massentransfusion [30]. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass solche Patienten unabhängig von der bereits vorhandenen posttraumatischen Destabilisierung des Immunsystems zusätzlich eine massive Triggerung des Immunsystems durch den Overload mit zusätzlichem Proteinmaterial und die Zufuhr von allopathen, jedoch in dem Körper aktiven, inflammatorischen Cytokinen bewältigen müssen, was zu ihrer schlechten Prognose beitragen könnte.

Die Frage, welche der beiden klinischen Entitäten, hämorrhagischem Schock vs. Massentransfusion, die Veränderungen in der Genexpression bewirkt, kann in der

vorliegenden Studie nicht und wahrscheinlich in keiner humanen Studie geklärt werden.

### **5.2.1. BCL2A**

Unter den untersuchten Parametern zeigt BCL-2A den höchsten prädiktiven Wert in der Receiver Operating Curve sechs Stunden nach dem Trauma. Die Expression dieses Faktors ist bei Patienten, die initial eine massive Erythrozytensubstitution erhalten haben, bei Aufnahme in den Schockraum und sechs sowie zwölf Stunden nach dem Trauma signifikant erhöht. Es ist bekannt, dass Mitglieder der BCL2-Familie das Überleben und die Zytokinresistenz von neutrophilen Granulozyten regulieren [130, 131]. Allerdings gibt es Hinweise in der Literatur, dass BCL2A in PMN-Granulozyten gesunder Patienten nur gering exprimiert wird [57]. Andere Studiengruppen zeigten, dass BCL2 in dendritischen Zellen bei schwer verletzten Patienten hoch reguliert war. Sie folgerten daraus, dass die Lebensdauer von Immunzellen bei Patienten mit einem schweren Trauma verlängert zu sein scheint [75]. Unsere Daten fügen dieser Erkenntnis hinzu, dass die mRNA von BCL2 vor allem bei polytraumatisierten Patienten mit schlechtem Outcome erhöht ist. Wir können über die Bedeutung dieses Mechanismus nur spekulieren. Es wäre möglich, dass die Fähigkeit der neutrophilen Granulozyten, ihre Lebensdauer zu verlängern, zu einer weiteren Verstärkung der Immunantwort führt, welche somit die Mortalität erhöhen könnte. Dieser Mechanismus könnte durch die allogene Erythrozyten-Substitution getriggert werden. Ein weiteres mögliches Szenario wäre, dass der Anstieg der BCL2-Expression bei verstorbenen Patienten ein Genregulationsmechanismus zur Verbesserung des Immunsystems sein könnte. Tiermodellstudien werden benötigt, um diese Fragen genauer zu klären.



### **5.2.2. MMP-9**

MMP-9 ist ein weiterer Faktor, der sowohl bei den verstorbenen Patienten als auch bei massentransfunden Patienten verstärkt war. Dieser scheint mit dem Vorliegen eines Schädel-Hirn-Traumas assoziiert zu sein. Dies wird später noch genauer diskutiert (Kapitel 5.5). Es kommt nicht nur in verschiedenen inflammatorischen Zuständen zu einer massiven Erhöhung von MMP-9, sondern auch bei Patienten mit einem Myokardinfarkt [20]. Es ist davon auszugehen, dass Patienten mit einem schweren hämorrhagischen Schock und/oder einem ungünstigen klinischen Outcome nach einem Polytrauma an einer gewissen Ischämie des Myokards leiden. Diese Ischämie ist wiederum Folge der hämorrhagischen Minderperfusion. In diesem Zusammenhang scheint die Ischämie des Myokards ein möglicher Grund für die verstärkte Expression von MMP-9 bei Patienten mit einem schweren hämorrhagischen Schock und Zustand nach massiver Substitution von Erythrozyten zu sein.

## **5.3. Differentielle Genexpression - Outcome**

### **5.3.1. ETS-2**

Polytraumatisierte Patienten, die in dem späteren posttraumatischen Verlauf verstarben, zeigten eine signifikant höhere ETS-2-Expression, verglichen mit den Patienten, die diese Zeitspanne überlebten. Die Mitglieder der ETS-Familie spielen bei unterschiedlichen intrazellulären Prozessen eine Rolle, vor allem bei der Entwicklung und der Umgestaltung von Endothelzellen und der Initiierung der vaskulären Inflammation [96].

Wei et al. konnten in einem meV Knockout-Mausmodell die Bedeutung von ETS-2 für die Persistenz der inflammatorischen Antwort demonstrieren. Hierbei fiel auf, dass ETS-2 Knockout-Mäuse eine reduzierte Inflammation und ein signifikant erhöhte

Überlebensrate im Vergleich zu den Mäusen des Wildtyps zeigten, was möglicherweise mit dem proinflammatorischen funktionalen Signalweg, der andere Transkriptionsfaktoren wie Jun, AP-1 und MMP mit ETS-2 verbindet, zusammenhängt [137]. Die Ergebnisse unserer Studie unterstützen nicht nur die Annahme, dass ETS-2 mit einem ungünstigen klinischen Outcome nach einem Polytrauma verbunden ist, sondern auch, dass es zusätzlich signifikant in dem Signalweg für die Initialisierung der fatalen inflammatorischen Kaskade involviert ist.

#### **5.4. Differentielle Genexpression - Massentransfusion von EK**

##### **5.4.1. IL-1 $\beta$ und MIP-1 $\beta$**

Patienten, die an einem schweren hämorrhagischen Schock leiden, der eine massive Applikation von Erythrozytenkonzentraten erfordert, haben zu den späteren Blutentnahmezeitpunkten signifikant niedrigere IL-1 $\beta$ -Werte als Patienten mit einer moderaten Substitutionsrate (<10 EK in den ersten 24 Stunden). Hildebrand et al. wiesen nach, dass IL-1 $\beta$  ein proinflammatorisches Zytokin ist, welches in polytraumatisierten Patienten und anderen inflammatorischen Zuständen hochreguliert wird [53]. Überraschenderweise zeigen sich geringere IL-1 $\beta$ -Genexpressionswerte bei Patienten mit überschießendem inflammatorischem Zustand aufgrund einer Überlastung mit fremden Proteinen. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens könnte in der Zeitdynamik der Genexpression der Zytokine liegen. Nur sowohl 48 als auch 72 Stunden nach einem Trauma können signifikante Veränderungen von IL-1 $\beta$  beobachtet werden. Somit könnte die Regulierung von IL-1 $\beta$  auf niedrige Werte als ein entgegenwirkender regulativer Mechanismus interpretiert werden.

IL-1 $\beta$  interagiert direkt mit MIP-1 $\beta$ , einem weiteren Zytokin, das mit dem AP-1 Signalweg in Verbindung steht. Dementsprechend konnten wir zeigen, dass es zu

einer Regulierung dieses Zytokins auf niedrige Werte bei den Patienten kommt, die eine massive Erythrozytensubstitution erhalten haben. MIP-1 $\beta$  vermittelt inflammatorische Reaktionen nach einem Trauma. Liener et al. konnten keine signifikante Korrelation zwischen dem Outcome und den MIP-1 $\beta$  Serumwerten beweisen [68]. Dies entspricht unseren Ergebnissen, denn auch wir konnten keine Korrelation zwischen dem Outcome und der MIP-1 $\beta$  Genexpression beobachten. Daten über die Bedeutung dieses Gens nach einer Blutung und nachfolgender Erythrozytenmassentransfusion liegen momentan in der Literatur nicht vor. Zum Zeitpunkt der Aufnahme konnte zwischen den von uns untersuchten Patientenkollektiven noch kein Unterschied der Genexpression von MIP-1 $\beta$  festgestellt werden. Signifikante Veränderungen in der Genexpression ereignen sich erst nach 12 und 24 Stunden. Da IL-1 $\beta$  und MIP-1 $\beta$  interagieren, könnte eine Gegenregulierung der Genexpression in unserem Patientenkollektiv erneut in Betracht gezogen werden.

## **5.5. Differentielle Genexpression - Verletzungsschwere (ISS) und Verletzungsmuster**

### **5.5.1. TIMP-1 und MMP-9**

Wir konnten keine Korrelation zwischen der Genexpression und des ISS Score-Systems nachweisen. Experimentelle Szenarien bei Nagetieren deuten darauf hin, dass die inflammatorische Reaktion direkt mit dem Ausmaß des Gewebeschadens und der Verletzungsschwere verbunden ist [101]. Studien an Menschen konnten allerdings oftmals keine direkte oder klare Verbindung zwischen der Verletzungsschwere und dem Ausmaß der Inflammation in Abwehrzellen aufdecken [94]. Die in dieser Studie untersuchte Expression der Gensignatur scheint außer bei TIMP-1 und MMP-9 nicht mit der Verletzungsschwere zu korrelieren.

Die Einteilung in unterschiedliche Verletzungsschweren anhand eines Score-Systems kann aufgrund der dichotomen Unterteilung durch klinische Schwankungen ein großes Potential an Fehlerquellen bergen. So besitzt eine Einteilung bezüglich des klinischen Outcomes eine bessere prognostische Aussage als Score-Systeme. Um komplexe Sachverhalte wie die der Verletzungsschwere darzustellen sind Score-Systeme jedoch unumgänglich.

TIMP-1 und MMP-9 hingegen weisen eine erhöhte Expression bei Patienten mit einem Schädel-Hirn-Trauma auf. Gardner et al. haben die Bedeutung der Balance zwischen TIMP und MMP auf das zentrale Nervensystem nach einer Verletzung geklärt [41]. Es wird vermutet, dass TIMP-1 die generellen posttraumatischen neuronalen Antworten moduliert und als ein Suppressor der Apoptose fungiert. Des Weiteren ist nachgewiesen, dass eine kontrollierte tierexperimentelle zerebrale Verletzung des Gehirnes zu einer Hochregulierung von TIMP-1 und MMP-9 führt [132]. Wir konnten in der vorliegenden Studie zeigen, dass beide Faktoren in neutrophilen Granulozyten aus dem Blut polytraumatisierter Patienten mit einem Schädel-Hirn-Trauma signifikant erhöht exprimiert werden. Möglicherweise konnte die TIMP-1 Überexpression die posttraumatische Entzündungsreaktion, die Apoptose und das daraus resultierende Hirnödem limitieren, also gewissermaßen einen Schutzmechanismus darstellen. Diese Hypothese wird von der Tatsache unterstützt, dass der sekundäre Schaden des Gehirns nach einem Schädel-Hirn-Trauma in MMP-9 Knockout Mäusen signifikant geringer ist als in Wildtyp Mäusen [133].

## **6. Zusammenfassung**

Der posttraumatische klinische Verlauf nach einem Polytrauma wird unter anderem von der Entwicklung eines SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) maßgeblich geprägt. Hierbei kommt es zu einer Beeinträchtigung der immunologischen Abwehr, welche sich häufig in ein MODS (Multi Organ Dysfunction Syndrome) und konsekutiv in ein MOF (Multi Organ Failure) entwickelt. Aufgrund der Verbesserung in der Initialversorgung und der deutlich gesenkten initialen Mortalität ist das posttraumatische Multiorganversagen die Hauptursache der Spätletalität.

Angeborene zelluläre Abwehrmechanismen nach einem Trauma sind von essentieller Bedeutung für die posttraumatische Entzündungsreaktion. Viele Studien konzentrierten sich auf die posttraumatische Reaktion von Monozyten. Die Rolle der neutrophilen Granulozyten (PMN) wurde in diesem Zusammenhang bislang jedoch nur unzureichend geklärt. Auch die Frage nach dem Vorliegen eines traumaspezifischen Expressionsmusters in neutrophilen Granulozyten, welches bereits bei Monozyten bewiesen werden konnte, wurde nur ansatzweise beantwortet.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es daher:

- (iv) zu untersuchen, ob es ein spezifisches Trauma-sensitives Genexpressionsmuster in PMN-Granulozyten polytraumatisierter Patienten in der frühen posttraumatischen Phase gibt,
- (v) zu überprüfen, ob ein spezifisches Genexpressionsprofil mit klinischen Parametern assoziiert ist
- (vi) und schließlich die prädiktive Aussagekraft dieser Gensignatur für den weiteren klinischen Verlauf zu untersuchen.

In einer genomweiten mRNA Studie an Monozyten von polytraumatisierten Patienten wurde gezeigt, dass es nach einem Polytrauma zu einer differentiell-regulierten Genexpression der Monozyten kommt. Diese baut sich um den Transkriptionsfaktor AP-1 auf. Mittels einer qRT-PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction) führten wir eine Untersuchung der mRNA Expression verschiedener, den Transkriptionsfaktorkomplex AP-1 bildender oder in engem Zusammenhang stehender Faktoren in neutrophilen Granulozyten polytraumatisierter Patienten in der frühen posttraumatischen Phase durch. Die Blutentnahmen erfolgten anhand unseres Protokolls bei Aufnahme in den Schockraum (innerhalb der ersten 90 Minuten nach Trauma), sowie 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach dem Trauma. Eingeschlossen wurden 40 Patienten (♂ 28, ♀ 12) mit einem ISS>16, von denen 28 überlebten. 15 Patienten hatten ein positives initiales CCT. Sechs Patienten verstarben an einem schweren Schädel-Hirn-Trauma. 22 Patienten benötigten in den ersten 24 Stunden mehr als zehn Erythrozytenkonzentrate.

Bei verstorbenen Patienten kam es sowohl nach 6 als auch nach 72 Stunden zu einem signifikanten Anstieg der BCL-2A Werte im Vergleich zu den Überlebenden. Bei der Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) zeigte sich eine Erhöhung der Genexpression nach sechs und 24 Stunden. Auch die Expression von ETS-2 zeigte erhöhte Werte sechs Stunden nach dem Trauma.

Bei Patienten, deren Verletzungsmuster von einem Schädel-Hirn-Trauma dominiert wurde (positives initiales CCT), zeigten sich signifikant erhöhte TIMP-1 Expressionslevel zu jedem untersuchten Zeitpunkt der Blutentnahmen. Zudem wird die Matrix Metalloproteinase-9 72 Stunden nach dem Trauma signifikant hochreguliert. Bezüglich des ISS (Injury Severity Score) zeigte sich keine signifikante Korrelation in allen untersuchten Genexpressionen.

Patienten mit Status nach EK-Massentransfusion hatten signifikant erhöhte BCL-2A Werte in der frühen posttraumatischen Phase. Außerdem war die Genexpression der Matrix Metalloproteinase-9 nach einem hämorrhagischen Schock und einer konsekutiven EK-Massentransfusion bei Aufnahme und nach 12 Stunden hochreguliert. Im Gegensatz hierzu wird die Genexpression des proinflammatorischen Zytokins Il-1 $\beta$  in der Gruppe der massentransfunden Patienten 48 und 72 Stunden nach dem Trauma signifikant herunterreguliert. Auch die mRNA des Chemokins MIP-1 $\beta$  wird in ähnlicher Weise bei diesem Patientensubkollektiv supprimiert, jedoch 12 und 24 Stunden nach dem Trauma.

Die Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos, die zusammen den AP-1 Transkriptionskomplex bilden, zeigten in allen von uns untersuchten klinischen Gruppen (Outcome, ISS, Vorliegen eines Schädel-Hirn-Traumas, EK-Massentransfusion) keine differentielle mRNA Expression.

Die Untersuchungen zeigen, dass es bei neutrophilen Granulozyten (PMN) zu einem ähnlichen Genexpressionsmuster wie bei Monozyten kommt. Die ROC-Berechnungen weisen auf ein beträchtliches prädiktives Potential der Tests bezüglich des klinischen Outcomes der polytraumatisierten Patienten anhand der Genexpression von BCL-2A, MMP-9 und TIMP-1 bereits 6 Stunden nach dem Trauma hin. Des Weiteren kann eine differentielle Regulierung von MMP-9, MIP-1 $\beta$  und Il-1 $\beta$  nach einer Massensubstitution mit allogenen Blutprodukten beobachtet werden. Vor allem TIMP-1 ist verstärkt bei Patienten mit einem Schädel-Hirn-Trauma messbar. Weitere Studien auf Proteinebene sind nötig, um zu untersuchen, inwieweit die auf Transkriptionsebene signifikant differentiell exprimierten Faktoren auch in biologisch wirksames Protein umgeschrieben werden.

## 7. Literatur

1. Andres, P.G., et al., *Mice with a selective deletion of the CC chemokine receptors 5 or 2 are protected from dextran sodium sulfate-mediated colitis: lack of CC chemokine receptor 5 expression results in a NK1.1+ lymphocyte-associated Th2-type immune response in the intestine.* J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6303-12.
2. Angele, M.K. and E. Faist, *Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection.* Crit Care, 2002. **6**(4): p. 298-305.
3. Angele, M.K., et al., *Gender dimorphism in trauma-hemorrhage-induced thymocyte apoptosis.* Shock, 1999. **12**(4): p. 316-22.
4. Bainton, D.F., J.L. Ulliyot, and M.G. Farquhar, *The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow.* J Exp Med, 1971. **134**(4): p. 907-34.
5. Baue, A.E., R. Durham, and E. Faist, *Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle?* Shock, 1998. **10**(2): p. 79-89.
6. Berry, N. and Y. Nishizuka, *Protein kinase C and T cell activation.* Eur J Biochem, 1990. **189**(2): p. 205-14.
7. Biberthaler, P., et al., *Genome-wide monocytic mRNA expression in polytrauma patients for identification of clinical outcome.* Shock, 2005. **24**(1): p. 11-9.
8. Biffl, W.L., et al., *Neutrophils are primed for cytotoxicity and resist apoptosis in injured patients at risk for multiple organ failure.* Surgery, 1999. **126**(2): p. 198-202.
9. Bogner, V., et al., *Hemorrhage and subsequent allogenic red blood cell transfusion are associated with characteristic monocyte messenger RNA expression patterns in patients after multiple injury-a genome wide view.* J Trauma, 2009. **67**(4): p. 792-801.
10. Bogner, V., et al., *Very early posttraumatic serum alterations are significantly associated to initial massive RBC substitution, injury severity, multiple organ failure and adverse clinical outcome in multiple injured patients.* Eur J Med Res, 2009. **14**(7): p. 284-91.
11. Bogner, V., et al., *Gene expression profiles are influenced by ISS, MOF, and clinical outcome in multiple injured patients: a genome-wide comparative analysis.* Langenbecks Arch Surg, 2007. **392**(3): p. 255-65.
12. Bone, R.C., *Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS).* Ann Intern Med, 1996. **125**(8): p. 680-7.
13. Botha, A.J., et al., *Postinjury neutrophil priming and activation: an early vulnerable window.* Surgery, 1995. **118**(2): p. 358-64; discussion 364-5.
14. Botha, A.J., et al., *Early neutrophil sequestration after injury: a pathogenic mechanism for multiple organ failure.* J Trauma, 1995. **39**(3): p. 411-7.
15. Bustin, S.A. and T. Nolan, *Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction.* J Biomol Tech, 2004. **15**(3): p. 155-66.
16. Cadroy, Y., et al., *Polymorphonuclear leukocytes modulate tissue factor production by mononuclear cells: role of reactive oxygen species.* J Immunol, 2000. **164**(7): p. 3822-8.
17. Carson, J.L., et al., *Risk of bacterial infection associated with allogeneic blood transfusion among patients undergoing hip fracture repair.* Transfusion, 1999. **39**(7): p. 694-700.
18. Cavaillon, J.M., et al., *Immunodepression in sepsis and SIRS assessed by ex vivo cytokine production is not a generalized phenomenon: a review.* J Endotoxin Res, 2001. **7**(2): p. 85-93.



19. Chertov, O., et al., *Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils*. J Exp Med, 1997. **186**(5): p. 739-47.
20. Chow, A.K., J. Cena, and R. Schulz, *Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature*. Br J Pharmacol, 2007. **152**(2): p. 189-205.
21. Chromek, M., et al., *Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 activates normal human granulocytes, protects them from apoptosis, and blocks their transmigration during inflammation*. Infect Immun, 2004. **72**(1): p. 82-8.
22. Cioffi, W.G., D.G. Burleson, and B.A. Pruitt, Jr., *Leukocyte responses to injury*. Arch Surg, 1993. **128**(11): p. 1260-7.
23. Como, J.J., et al., *Blood transfusion rates in the care of acute trauma*. Transfusion, 2004. **44**(6): p. 809-13.
24. Cotter, M.J., et al., *A novel method for isolation of neutrophils from murine blood using negative immunomagnetic separation*. Am J Pathol, 2001. **159**(2): p. 473-81.
25. Deitch, E.A., *Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy*. Ann Surg, 1992. **216**(2): p. 117-34.
26. Deitch, E.A. and M.C. Mancini, *Complement receptors in shock and transplantation*. Arch Surg, 1993. **128**(11): p. 1222-6.
27. Deitch, E.A., R. Rutan, and J.P. Waymack, *Trauma, shock, and gut translocation*. New Horiz, 1996. **4**(2): p. 289-99.
28. Dinarello, C.A., *The interleukin-1 family: 10 years of discovery*. Faseb J, 1994. **8**(15): p. 1314-25.
29. Dinarello, C.A., *Proinflammatory cytokines*. Chest, 2000. **118**(2): p. 503-8.
30. Dunne, J.R., et al., *Allogenic blood transfusion in the first 24 hours after trauma is associated with increased systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and death*. Surg Infect (Larchmt), 2004. **5**(4): p. 395-404.
31. Eferl, R. and E.F. Wagner, *AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(11): p. 859-68.
32. Egger, G., et al., *Blood polymorphonuclear leukocyte migration as a predictive marker for infections in severe trauma: comparison with various inflammation parameters*. Intensive Care Med, 2004. **30**(2): p. 331-4.
33. Ertel, W., et al., *Release of anti-inflammatory mediators after mechanical trauma correlates with severity of injury and clinical outcome*. J Trauma, 1995. **39**(5): p. 879-85; discussion 885-7.
34. Ertel, W., et al., *[Significance of systemic inflammation in 1,278 trauma patients]*. Unfallchirurg, 1998. **101**(7): p. 520-6.
35. Faist, E., et al., *Depression of cellular immunity after major injury. Its association with posttraumatic complications and its reversal with immunomodulation*. Arch Surg, 1986. **121**(9): p. 1000-5.
36. Faist, E., et al., *Inadequate interleukin-2 synthesis and interleukin-2 messenger expression following thermal and mechanical trauma in humans is caused by defective transmembrane signalling*. J Trauma, 1993. **34**(6): p. 846-53; discussion 853-4.
37. Fleige, S., et al., *Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR*. Biotechnol Lett, 2006. **28**(19): p. 1601-13.
38. Foletta, V.C., D.H. Segal, and D.R. Cohen, *Transcriptional regulation in the immune system: all roads lead to AP-1*. J Leukoc Biol, 1998. **63**(2): p. 139-52.
39. Fosse, E., et al., *Complement activation following multiple injuries*. Acta Chir Scand, 1987. **153**(5-6): p. 325-30.

40. Fung, Y.L., et al., *The systemic inflammatory response syndrome induces functional changes and relative hyporesponsiveness in neutrophils*. J Crit Care, 2008. **23**(4): p. 542-9.
41. Gardner, J. and A. Ghorpade, *Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1: the TIMPed balance of matrix metalloproteinases in the central nervous system*. J Neurosci Res, 2003. **74**(6): p. 801-6.
42. Gebhard, F. and M. Huber-Lang, *Polytrauma--pathophysiology and management principles*. Langenbecks Arch Surg, 2008. **393**(6): p. 825-31.
43. Gebhard, F., et al., *Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans?* Arch Surg, 2000. **135**(3): p. 291-5.
44. Ginzinger, D.G., *Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream*. Exp Hematol, 2002. **30**(6): p. 503-12.
45. Goodman, E.R., et al., *Role of interleukin 8 in the genesis of acute respiratory distress syndrome through an effect on neutrophil apoptosis*. Arch Surg, 1998. **133**(11): p. 1234-9.
46. Greenspan, L., B.A. McLellan, and H. Greig, *Abbreviated Injury Scale and Injury Severity Score: a scoring chart*. J Trauma, 1985. **25**(1): p. 60-4.
47. Grotz, M., et al., *[DRG reimbursement for multiple trauma patients -- a comparison with the comprehensive hospital costs using the German trauma registry]*. Unfallchirurg, 2004. **107**(1): p. 68-75.
48. Hasegawa, H., et al., *A role for AP-1 in matrix metalloproteinase production and invadopodia formation of v-Crk-transformed cells*. Exp Cell Res, 2009. **315**(8): p. 1384-92.
49. Hassoun, H.T., et al., *Post-injury multiple organ failure: the role of the gut*. Shock, 2001. **15**(1): p. 1-10.
50. Hauser, C.J., et al., *Tumor necrosis factor alpha gene expression in human peritoneal macrophages is suppressed by extra-abdominal trauma*. Arch Surg, 1995. **130**(11): p. 1186-91; discussion 1191-2.
51. Hecke, F., et al., *Circulating complement proteins in multiple trauma patients--correlation with injury severity, development of sepsis, and outcome*. Crit Care Med, 1997. **25**(12): p. 2015-24.
52. Henrion, J., *Ischemia/reperfusion injury of the liver: pathophysiologic hypotheses and potential relevance to human hypoxic hepatitis*. Acta Gastroenterol Belg, 2000. **63**(4): p. 336-47.
53. Hildebrand, F., H.C. Pape, and C. Krettek, *[The importance of cytokines in the posttraumatic inflammatory reaction]*. Unfallchirurg, 2005. **108**(10): p. 793-4, 796-803.
54. Hoch, R.C., et al., *Effects of accidental trauma on cytokine and endotoxin production*. Crit Care Med, 1993. **21**(6): p. 839-45.
55. Hoffmann, U., et al., *Matrix-metalloproteinases and their inhibitors are elevated in severe sepsis: prognostic value of TIMP-1 in severe sepsis*. Scand J Infect Dis, 2006. **38**(10): p. 867-72.
56. Huber-Wagner, S., et al., *Massive blood transfusion and outcome in 1062 polytrauma patients: a prospective study based on the Trauma Registry of the German Trauma Society*. Vox Sang, 2007. **92**(1): p. 69-78.
57. Iwai, K., et al., *Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils*. Blood, 1994. **84**(4): p. 1201-8.
58. Jordan, M.S., A.L. Singer, and G.A. Koretzky, *Adaptors as central mediators of signal transduction in immune cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(2): p. 110-6.

59. Kampalath, B., et al., *Monocytes with altered phenotypes in posttrauma patients*. Arch Pathol Lab Med, 2003. **127**(12): p. 1580-5.
60. Keel, M., et al., *Different pattern of local and systemic release of proinflammatory and anti-inflammatory mediators in severely injured patients with chest trauma*. J Trauma, 1996. **40**(6): p. 907-12; discussion 912-4.
61. Kell, M.R., et al., *Injury primes the immune system for an enhanced and lethal T-cell response against bacterial superantigen*. Shock, 1999. **12**(2): p. 139-44.
62. Kelly, J.L., et al., *Is circulating endotoxin the trigger for the systemic inflammatory response syndrome seen after injury?* Ann Surg, 1997. **225**(5): p. 530-41; discussion 541-3.
63. Kreth, S., et al., *Differential expression of 5'-UTR splice variants of the adenosine A2A receptor gene in human granulocytes: identification, characterization, and functional impact on activation*. Faseb J, 2008. **22**(9): p. 3276-86.
64. Kriegstein, C.F. and D.N. Granger, *Adhesion molecules and their role in vascular disease*. Am J Hypertens, 2001. **14**(6 Pt 2): p. 44S-54S.
65. Kuhne, C.A., et al., *[Trauma centers in Germany. Status report]*. Unfallchirurg, 2006. **109**(5): p. 357-66.
66. Lederer, J.A., M.L. Rodrick, and J.A. Mannick, *The effects of injury on the adaptive immune response*. Shock, 1999. **11**(3): p. 153-9.
67. Lefering, R., et al., *Revision of the multiple organ failure score*. Langenbecks Arch Surg, 2002. **387**(1): p. 14-20.
68. Liener, U.C., et al., *Chemokine activation within 24 hours after blunt accident trauma*. Shock, 2002. **17**(3): p. 169-72.
69. Lin, E., S.E. Calvano, and S.F. Lowry, *Inflammatory cytokines and cell response in surgery*. Surgery, 2000. **127**(2): p. 117-26.
70. Lipton, P., *Ischemic cell death in brain neurons*. Physiol Rev, 1999. **79**(4): p. 1431-568.
71. Luther, S.A. and J.G. Cyster, *Chemokines as regulators of T cell differentiation*. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 102-7.
72. Ma, J., et al., *Regulation of macrophage activation*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(11): p. 2334-46.
73. Mackay, C.R., *Chemokines: immunology's high impact factors*. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 95-101.
74. Macleod, K., D. Leprince, and D. Stehelin, *The ets gene family*. Trends Biochem Sci, 1992. **17**(7): p. 251-6.
75. Maier, M., et al., *Altered gene expression patterns in dendritic cells after severe trauma: implications for systemic inflammation and organ injury*. Shock, 2008. **30**(4): p. 344-51.
76. Majetschak, M., et al., *Whole blood tumor necrosis factor-alpha production and its relation to systemic concentrations of interleukin 4, interleukin 10, and transforming growth factor-beta1 in multiply injured blunt trauma victims*. Crit Care Med, 2000. **28**(6): p. 1847-53.
77. Majetschak, M., et al., *Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma patients*. Ann Surg, 1999. **230**(2): p. 207-14.
78. Malone, D.L., et al., *Blood transfusion, independent of shock severity, is associated with worse outcome in trauma*. J Trauma, 2003. **54**(5): p. 898-905; discussion 905-7.
79. Mannick, J.A., M.L. Rodrick, and J.A. Lederer, *The immunologic response to injury*. J Am Coll Surg, 2001. **193**(3): p. 237-44.
80. Massberg, S. and K. Messmer, *The nature of ischemia/reperfusion injury*. Transplant Proc, 1998. **30**(8): p. 4217-23.

81. Matsuda, N. and Y. Hattori, *Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy*. J Pharmacol Sci, 2006. **101**(3): p. 189-98.
82. Matsukawa, A., et al., *Pivotal role of signal transducer and activator of transcription (Stat)4 and Stat6 in the innate immune response during sepsis*. J Exp Med, 2001. **193**(6): p. 679-88.
83. Maurer, M. and E. von Stebut, *Macrophage inflammatory protein-1*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(10): p. 1882-6.
84. Menger, M.D., et al., *Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox"*. Am J Physiol, 1992. **263**(6 Pt 2): p. H1901-6.
85. Menten, P., A. Wuyts, and J. Van Damme, *Macrophage inflammatory protein-1*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(6): p. 455-81.
86. Metcalf, D., *The molecular control of granulocytes and macrophages*. Ciba Found Symp, 1997. **204**: p. 40-50; discussion 50-6.
87. Mollinedo, F., N. Borregaard, and L.A. Boxer, *Novel trends in neutrophil structure, function and development*. Immunol Today, 1999. **20**(12): p. 535-7.
88. Moore, F.A., E.E. Moore, and A. Sauaia, *Blood transfusion. An independent risk factor for postinjury multiple organ failure*. Arch Surg, 1997. **132**(6): p. 620-4; discussion 624-5.
89. Murdoch, C. and A. Finn, *Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases*. Blood, 2000. **95**(10): p. 3032-43.
90. Nakamura, T., et al., *Modulation of plasma metalloproteinase-9 concentrations and peripheral blood monocyte mRNA levels in patients with septic shock: effect of fiber-immobilized polymyxin B treatment*. Am J Med Sci, 1998. **316**(6): p. 355-60.
91. Nast-Kolb, D., et al., *Multiple organ failure still a major cause of morbidity but not mortality in blunt multiple trauma*. J Trauma, 2001. **51**(5): p. 835-41; discussion 841-2.
92. Nast-Kolb, D., et al., *Indicators of the posttraumatic inflammatory response correlate with organ failure in patients with multiple injuries*. J Trauma, 1997. **42**(3): p. 446-54; discussion 454-5.
93. Neidhardt, R., et al., *Relationship of interleukin-10 plasma levels to severity of injury and clinical outcome in injured patients*. J Trauma, 1997. **42**(5): p. 863-70; discussion 870-1.
94. Ni Choileain, N. and H.P. Redmond, *The immunological consequences of injury*. Surgeon, 2006. **4**(1): p. 23-31.
95. Nishibori, M., H.K. Takahashi, and S. Mori, *The regulation of ICAM-1 and LFA-1 interaction by autacoids and statins: a novel strategy for controlling inflammation and immune responses*. J Pharmacol Sci, 2003. **92**(1): p. 7-12.
96. Oettgen, P., *Regulation of vascular inflammation and remodeling by ETS factors*. Circ Res, 2006. **99**(11): p. 1159-66.
97. Opdenakker, G., P.E. Van den Steen, and J. Van Damme, *Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions*. Trends Immunol, 2001. **22**(10): p. 571-9.
98. Pape, H.C., et al., *Major secondary surgery in blunt trauma patients and perioperative cytokine liberation: determination of the clinical relevance of biochemical markers*. J Trauma, 2001. **50**(6): p. 989-1000.
99. Pellegrini, J.D., et al., *Relationships between T lymphocyte apoptosis and anergy following trauma*. J Surg Res, 2000. **88**(2): p. 200-6.
100. Picker, L.J., et al., *Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry*. Blood, 1995. **86**(4): p. 1408-19.
101. Pillay, J., et al., *The systemic inflammatory response induced by trauma is reflected by multiple phenotypes of blood neutrophils*. Injury, 2007. **38**(12): p. 1365-72.

102. Proudfoot, A.E., et al., *Strategies for chemokine antagonists as therapeutics*. Semin Immunol, 2003. **15**(1): p. 57-65.
103. Rabb, H., *The T cell as a bridge between innate and adaptive immune systems: implications for the kidney*. Kidney Int, 2002. **61**(6): p. 1935-46.
104. Rabinovici, R., et al., *Serum tumor necrosis factor-alpha profile in trauma patients*. J Trauma, 1993. **35**(5): p. 698-702.
105. Rebuck, J.W. and J.H. Crowley, *A method of studying leukocytic functions in vivo*. Ann N Y Acad Sci, 1955. **59**(5): p. 757-805.
106. Rebutla, P., et al., *White cell-reduced red cells prepared by filtration: a critical evaluation of current filters and methods for counting residual white cells*. Transfusion, 1993. **33**(2): p. 128-33.
107. Regel, G., et al., *Treatment results of patients with multiple trauma: an analysis of 3406 cases treated between 1972 and 1991 at a German Level I Trauma Center*. J Trauma, 1995. **38**(1): p. 70-8.
108. Rose, S. and I. Marzi, *Mediators in polytrauma--pathophysiological significance and clinical relevance*. Langenbecks Arch Surg, 1998. **383**(3-4): p. 199-208.
109. Roumen, R.M., et al., *Inflammatory mediators in relation to the development of multiple organ failure in patients after severe blunt trauma*. Crit Care Med, 1995. **23**(3): p. 474-80.
110. Salottolo, K., et al., *The impact of the AIS 2005 revision on injury severity scores and clinical outcome measures*. Injury, 2009. **40**(9): p. 999-1003.
111. Samy, T.S., et al., *Trauma-hemorrhage activates signal transduction pathways in mouse splenic T cells*. Shock, 1998. **9**(6): p. 443-50.
112. Sauaia, A., et al., *Epidemiology of trauma deaths: a reassessment*. J Trauma, 1995. **38**(2): p. 185-93.
113. Savill, J., et al., *Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis*. Immunol Today, 1993. **14**(3): p. 131-6.
114. Schinkel, C., et al., *Functional analysis of monocyte subsets in surgical sepsis*. J Trauma, 1998. **44**(5): p. 743-8; discussion 748-9.
115. Seekamp, A., et al., *Cytokines and adhesion molecules in elective and accidental trauma-related ischemia/reperfusion*. J Trauma, 1998. **44**(5): p. 874-82.
116. Seely, A.J., J.L. Pascual, and N.V. Christou, *Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance*. Crit Care, 2003. **7**(4): p. 291-307.
117. Seibel, R., et al., *Blunt multiple trauma (ISS 36), femur traction, and the pulmonary failure-septic state*. Ann Surg, 1985. **202**(3): p. 283-95.
118. Sementchenko, V.I. and D.K. Watson, *Ets target genes: past, present and future*. Oncogene, 2000. **19**(55): p. 6533-48.
119. Shaulian, E. and M. Karin, *AP-1 as a regulator of cell life and death*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(5): p. E131-6.
120. Silliman, C.C., *The two-event model of transfusion-related acute lung injury*. Crit Care Med, 2006. **34**(5 Suppl): p. S124-31.
121. Soehnlein, O., A. Zernecke, and C. Weber, *Neutrophils launch monocyte extravasation by release of granule proteins*. Thromb Haemost, 2009. **102**(2): p. 198-205.
122. Suni, M.A., L.J. Picker, and V.C. Maino, *Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry*. J Immunol Methods, 1998. **212**(1): p. 89-98.
123. Svoboda, P., I. Kantorova, and J. Ochmann, *Dynamics of interleukin 1, 2, and 6 and tumor necrosis factor alpha in multiple trauma patients*. J Trauma, 1994. **36**(3): p. 336-40.

124. Swank, G.M. and E.A. Deitch, *Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes*. World J Surg, 1996. **20**(4): p. 411-7.
125. Szabo, C., *The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury*. Shock, 1996. **6**(2): p. 79-88.
126. Tscherne, H., et al., *[Degree of severity and priorities in multiple injuries]*. Chirurg, 1987. **58**(10): p. 631-40.
127. van der Poll, T., et al., *Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis*. J Immunol, 1995. **155**(11): p. 5397-401.
128. van der Pouw Kraan, T.C., et al., *Acute experimental colitis and human chronic inflammatory diseases share expression of inflammation-related genes with conserved Ets2 binding sites*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(2): p. 224-35.
129. Van Roy, M., et al., *The use of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases to increase the efficacy of a tumor necrosis factor/interferon gamma antitumor therapy*. Cancer Gene Ther, 2007. **14**(4): p. 372-9.
130. Villunger, A., et al., *Fas ligand, Bcl-2, granulocyte colony-stimulating factor, and p38 mitogen-activated protein kinase: Regulators of distinct cell death and survival pathways in granulocytes*. J Exp Med, 2000. **192**(5): p. 647-58.
131. Villunger, A., et al., *Essential role for the BH3-only protein Bim but redundant roles for Bax, Bcl-2, and Bcl-w in the control of granulocyte survival*. Blood, 2003. **101**(6): p. 2393-400.
132. von Gertten, C., et al., *Increases in matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 mRNA after cerebral contusion and depolarisation*. J Neurosci Res, 2003. **73**(6): p. 803-10.
133. Wang, X., et al., *Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on morphological and motor outcomes after traumatic brain injury*. J Neurosci, 2000. **20**(18): p. 7037-42.
134. Ward, P.A., *Chemotoxis of mononuclear cells*. J Exp Med, 1968. **128**(5): p. 1201-21.
135. Ward, P.A., *Role of the complement in experimental sepsis*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(3): p. 467-70.
136. Waydhas, C. and D. Nast-Kolb, *Scores in polytrauma--do they help?* Langenbecks Arch Surg, 1998. **383**(3-4): p. 209-13.
137. Wei, G., et al., *Activated Ets2 is required for persistent inflammatory responses in the motheaten viable model*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 1374-9.
138. Wewers, M.D., *IL-1beta: an endosomal exit*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(28): p. 10241-2.
139. Wood, J.J., et al., *Inadequate interleukin 2 production. A fundamental immunological deficiency in patients with major burns*. Ann Surg, 1984. **200**(3): p. 311-20.
140. Xing, L. and D.G. Remick, *Relative cytokine and cytokine inhibitor production by mononuclear cells and neutrophils*. Shock, 2003. **20**(1): p. 10-6.
141. Yao, Y.M., et al., *The inflammatory basis of trauma/shock-associated multiple organ failure*. Inflamm Res, 1998. **47**(5): p. 201-10.
142. Yoshimura, T., et al., *Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9233-7.
143. Zahler, S., et al., *The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method*. J Immunol Methods, 1997. **200**(1-2): p. 173-9.
144. Zallen, G., et al., *Stored red blood cells selectively activate human neutrophils to release IL-8 and secretory PLA2*. Shock, 2000. **13**(1): p. 29-33.
145. Zhou, L., et al., *Tumor necrosis factor-alpha induced expression of matrix metalloproteinase-9 through p21-activated kinase-1*. BMC Immunol, 2009. **10**: p. 15.

146. Zwacka, R.M., et al., *Redox gene therapy for ischemia/reperfusion injury of the liver reduces AP1 and NF-kappaB activation*. Nat Med, 1998. **4**(6): p. 698-704.

## **8. Abkürzungen**

<b>AIS</b>	Abbreviated injury scale
<b>AP-1</b>	Activating protein-1
<b>ARDS</b>	Acute respiratory distress syndrome
<b>AUC</b>	Area under the curve
<b>BCL2A</b>	B-cel lymphoma 2 a
<b>C5a</b>	Complement 5a
<b>CARS</b>	Compensatory anti-inflammatory response syndrome
<b>CCL</b>	CC chemokine ligand
<b>CCT</b>	Schädelcomputertomographie
<b>CD-15</b>	Cluster of differentiation antigen 15
<b>c-FOS</b>	Transkriptionsfaktor
<b>c-JUN</b>	Transkriptionsfaktor
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>EK</b>	Erythrozytenkonzentrat
<b>ETS-2</b>	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2
<b>ICAM-1</b>	Intracellular adhesion molecule
<b>IL-1 <math>\beta</math></b>	Interleukin-1 $\beta$
<b>IRS</b>	Inflammatory response syndrome
<b>ISS</b>	Injury severity score
<b>LAT</b>	Linker of activated T-cells
<b>MHC</b>	Major histocompatibility complex
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	Macrophage inflammatory potein-1
<b>MMP-9</b>	Matrix Metalloproteinase-9
<b>MODS</b>	Multiple organ dysfunction syndrome
<b>MOF</b>	Multiple organ failure
<b>mRNA</b>	Messenger Ribonukleinsäure
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nekrosefaktor- $\kappa$ B
<b>NK-Zellen</b>	Natürliche Killerzellen
<b>PAF</b>	Platelet-activating factor
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PMN</b>	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten



<b>qRT-PCR</b>	Quantitative Realtime-PCR
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>ROC</b>	Receiver operating curve
<b>SHT</b>	Schädel-Hirn-Trauma
<b>SIRS</b>	Systemic inflammatory response syndrome
<b>TGF- <math>\beta</math></b>	Transforming growth factor $\beta$
<b>TIMP-1</b>	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1
<b>TNF-alpha</b>	Tumornekrosefaktor

## **9. Danksagungen**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter Biberthaler für die wissenschaftliche und fachliche Betreuung meiner Promotion sowie für die Überlassung meines Dissertationsthemas. Für seine große Hilfsbereitschaft nicht nur bei fachlichen Fragestellungen bin ich sehr dankbar.

Zudem danke ich Herrn Prof. Dr. W. Mutschler, Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Unterstützung bei der Dissertation sowie für die Bereitstellung des Labors und der Arbeitsmittel.

Des Weiteren bedanke ich mich sehr bei Dr. Viktoria Bogner. Dank ihres unermüdlichen Engagements erlernte ich das wissenschaftliche Arbeiten. Zudem stand sie jederzeit geduldig für wissenschaftliche Fragen und Diskussionen zur Verfügung.

Herrn PD Dr. K.-G. Kanz, Frau Dr. Th. Hummel und Dr. L. Ney sowie allen Ärzten und Pflegekräften der Chirurgischen Notfallaufnahme und der Chirurgischen Intensivstation der Chirurgischen Klinik Innenstadt der LMU München danke ich für ihre nachhaltige Unterstützung. Besonderer Dank gilt außerdem Veit Stöcklein, Christian Suren und Leonhard Keil für die gegenseitige Hilfe und Unterstützung. Ohne diese Co-Doktoranden wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Schließlich danke ich meinen geliebten Eltern und Geschwistern für ihre große Geduld. Sie ermöglichten mir das Studium und deshalb letztlich auch diese Dissertation.

## **10. Publikationen**

### **Zitierfähige Abstracts:**

**Richter P**, Bogner V, Mutschler W, Biberthaler P

CCL-3 concentrations in monocyte mrna and serum of multiple injured patients: a comparative analysis between genome response and serum protein levels.

Langenbeck's Archives of Surgery Volume 393, Number 5: Seite 799-800

Poster präsentiert auf den 12. Chirurgischen Forschungstagen, Freiburg, 25. - 27.09.2008

**Richter P**, Bogner V, Stoecklein V, Suren C, Mutschler W, Biberthaler P

CCL-4 concentrations in serum of multiple injured patients in correlation to injury severity.

Langenbeck's Archives of Surgery Volume 394, Number 5: Seite 957

Poster präsentiert auf den 13. Chirurgischen Forschungstagen, München, 10. - 12.09.2009

Stoecklein V, Bogner V, **Richter P**, Suren C, Teupser D, Thiery J, Mutschler W, Biberthaler P

Increased activation of c-Jun in monocytes of patients with multiple injuries is associated with adverse outcome.

Langenbeck's Archives of Surgery Volume 394, Number 5: Seite 957

Suren C, Bogner V, **Richter P**, Stoecklein V, Teupser D, Mutschler W, Biberthaler P

Serum protein expression profiles of polytrauma patients in the initial post-traumatic period is correlating with injury severity.

Langenbeck's Archives of Surgery Volume 394, Number 5: Seite 955